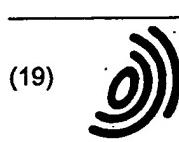


D4



(19)

Euro<sup>pe</sup>isches Patentamt

European Patent Office

Office européen des brevets



(11)

EP 0 853 238 B1

(12)

## EUROPÄISCHE PATENTSCHRIFT

A7

(45) Veröffentlichungstag und Bekanntmachung des  
Hinweises auf die Patenterteilung:  
18.09.2002 Patentblatt 2002/38

(51) Int Cl.7: G01N 1/42.

(21) Anmeldenummer: 98100251.2

(22) Anmeldetag: 09.01.1998

### (54) Probenhalter für wasserhaltige Proben sowie Verfahren zu deren Verwendung

Sample holder for water-containing samples and method for use thereof

Dispositif port échantillon pour échantillons contenant de l'eau et procédé d'utilisation d'un tel dispositif

(84) Benannte Vertragsstaaten:  
AT CH DE GB LI

(74) Vertreter: Dolder, Fritz  
Rosenbergstrasse 6

(30) Priorität: 13.01.1997 CH 5397

Postfach 558

8304 Wallisellen-Zürich (CH)

(43) Veröffentlichungstag der Anmeldung:  
15.07.1998 Patentblatt 1998/29

(56) Entgegenhaltungen:

EP-A- 0 275 829

WO-A-96/02801

DE-A- 1 806 741

US-A- 4 688 387

(73) Patentinhaber: Studer, Daniel, Dr.  
3293 Dotzigen (BE) (CH)

• HOHENBERG H ET AL: "HIGH-PRESSURE  
FREEZING OF CELL SUSPENSIONS IN  
CELLULOSE CAPILLARY TUBES" JOURNAL OF  
MICROSCOPY, Bd. 175, Nr. PART 01, Juli 1994,  
Seiten 34-43, XP000645911

(72) Erfinder: Studer, Daniel, Dr.  
3293 Dotzigen (BE) (CH)

0 853 238 B1

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen.

BEST AVAILABLE COPY

## Beschreibung

[0001] Die Erfindung bezieht sich auf Probenhalter für wasserhaltige Proben, sowie auf ein Verfahren zu deren Verwendung, vorzugsweise für das Gefrieren unter hohem Druck.

[0002] Die Anwendung tiefer Temperaturen zur Erhaltung biologischer Objekte (Zellen, Gewebe, Organe) während längerer Zeit in lebensfähigem Zustand hat zur Entwicklung der Technik der sog. Kryopreservation geführt. In WO 96/02801 entsprechend PCT/GB95/01677 werden Probenhalter eingesetzt, welche aus Kupferröhrchen von 3.8 mm Durchmesser und einer Länge von 134 mm bestehen, in denen Kapillaren aus Kunststoff von 0.25 oder 0.5 ml Volumen mit den biologischen Proben gesteckt werden. Zwischen der Innenwand der Kupferröhrchen und der Kunststoffkapillare mit der Probe befindet sich eine dünne Luftschicht, welche verhindert, dass sich beim Abkühlen der Probe ein vertikaler Temperaturgradient bildet. Eine grössere Zahl derartiger Kupferröhrchen werden zu einem Probenhalter vereinigt und in vertikaler Position in ein Kühlmedium getaucht derart, dass dieses Kühlmedium zwischen den einzelnen Röhrchen passieren kann.

[0003] In US-PS 4,688,387 (Conaway) wird eine biologische Probe von den Ausmassen eines Organs zur Kryopreservation vor dem Abkühlen unter Druck gesetzt, welcher ausreicht, um die Bildung von Eis I beim nachfolgenden Abkühlen der Probe zu verhindern, typischerweise Drücke über 2100 atm. Das Verfahren umfasst nach der Vorpräparation des Organs bei Zimmertemperatur eine *langsame und stetige* Erhöhung des Drucks auf einen zur Verhinderung der Eisbildung erforderlichen Wert. Anschliessend wird die Probe auf kryogene Temperaturen unter 173 °K abgekühlt. Schliesslich wird der Druck unter Aufrechterhaltung der kryogenen Temperatur wieder auf Atmosphärendruck reduziert derart, dass in einem metastabilen Zustand eine andere Phase als kristallines Eis I aufrechterhalten wird.

[0004] Völlig anderen Zwecken dienen die Verfahren des schnellen Gefrierens wasserhaltiger Proben unter hohem Druck, welche als Präparationstechnik für bildgebende Verfahren in der Elektronenmikroskopie oder der Lichtmikroskopie eingesetzt werden. Derartige Verfahren bezwecken eine möglichst schnelle Vitrifizierung lebender Proben von geringen Ausmassen (Millimeterbereich) unter optimaler Aufrechterhaltung der dreidimensionalen Strukturen dieser Proben, wobei ein Überleben der Proben durch die Eiskristallbildung beim Auftauen ausgeschlossen ist. Ein derartiges Verfahren des Hochdruckgefrierens zum Zwecke der Präparation ist aus der deutschen Patentschrift DE-PS 1 806 741 bekannt.

[0005] Der Vorteil des Gefrierens unter hohem Druck gegenüber Normaldruck kann folgendermassen erklärt werden: Appliziert man während des Abkühlens ca. 2000 bar Druck auf die Probe, so reduziert sich die zur Vitrifikation (keine Eiskristallbildung, keine Segregatio-

nen) benötigte Abkühlrate um den Faktor hundert, damit ist es möglich maximal 200µm dicke, scheibenförmige Proben zu vitrifizieren. Es ist ebenfalls festzuhalten, dass bei alffälliger Eisbildung unter Druck die Maschengrösse der Segregationsmuster stark reduziert ist, d.h. ca. 200µm dicke wässrige Proben unter 2000 bar gefroren sind ultrastrukturell (Nanometerbereich) optimal erhalten (STUDER D., MICHEL M., WOHLWEND M., HUNZIKER E.B. und BUSCHMANN M.D., Vitrification of articular cartilage by high pressure freezing, J. of Microscopy 179 (1995), 312-332). Bis heute wurde der Vorteil für das Einfrieren unter hohem Druck für verhältnismässig dicke Proben (Probendicke im Bereich um 2 mm) nicht erkannt. Die Reduktion der Maschengrösse der Segregationsmuster bewirkt, dass derartige Proben im Lichtmikroskop optimal erhalten scheinen, da die im µm-Bereich liegenden Segregationen nicht sichtbar sind.

[0006] Der in der Patentschrift DE-B 1 806 741 beschriebene Probenhalter eignet sich schlecht für die Weiterverarbeitung der gefrorenen Proben. Es handelt sich dabei um einen röhrenförmigen, einseitig geschlossenen, dünnwandigen Behälter aus z.B. Kupfer, der an seinem oberen Ende trichterförmig erweitert ist. Die

Probe im Innern dieses Probenhalters wird durch eine Hydraulik unter Verwendung einer Druckübertragerflüssigkeit, beispielsweise Wasser, unter Druck gesetzt und durch Aufspritzen eines Kühlmittels von aussen abgekühlt. Es ist bei dieser Vorrichtung fast unmöglich, die Proben nach dem Gefrieren weiter zu verarbeiten. Durch das Anbringen einer Sollbruchstelle konnte wenigstens die sogenannte Gefrierätztechnik (freeze etching) angewendet werden. Mit dieser Technik werden dünne Metallabdrücke hergestellt, die untersucht werden können.

[0007] Die kommerziell erhältlichen Hochdruckgefriergeräte nach dem Stand der Technik verfahren folgendermassen: Sie verwenden flüssigen Stickstoff von ca. -150°C sowohl als Druckübertragungs- wie auch als Kühlmittel. Dessen Temperatur beträgt bei Normaldruck -196°C, bei 2000 atm ist er bei dieser Temperatur fest. Die apparativen Nachteile derartiger Anlagen, bei denen flüssiger Stickstoff sowohl als Druckübertragungs- als auch als Kühlmittel eingesetzt wird, bestehen in folgendem: Die Maschinen sind verhältnismässig gross (ca. 0.8x1.6x1.5m<sup>3</sup>) und schwer (>600kg). Ihr Einsatz ist mit einem Unfallrisiko für das Bedienungspersonal verbunden: Das Aufspritzen von mehr als 100 ml flüssigem Stickstoff unter 2000 bar erfordert relativ grosse Bohrungen in der Druckkammer, welche dementsprechend sehr massiv konstruiert werden muss. Unfälle sind bekannt; bis heute entstanden keine Personenschäden, der Sachschaden kann jedoch sehr hoch ausfallen (5-20kFr.). Die Kosten dieser Apparaturen sind nach wie vor verhältnismässig hoch, da sie in kleinen Stückzahlen aus hochwertigen Werkstoffen gefertigt werden müssen (150-300kFr.).

[0008] Die biologischen Proben befinden sich in der-

artigen Anlagen in zwei dünnwandigen metallischen Halbschalen (sog. aluminium sandwich: 3 mm Aussen-durchmesser, innerer Durchmesser 2 mm, mit variabler Hohlraumdicke von 100-600µm), die zwischen zwei Stahllamellen festgeklemmt werden. Diese Lamellen sind ihrerseits an einem massiven Stahlkolben (Probenhalter) festgeschraubt. Dieser Probenhalter wird mit der Probe in eine Hochdruckkammer eingeführt und durch einen massiven Querbolzen arretiert. Die Hochdruckkammer wird durch einen dichtenden O-Ring am Probenhalter verschlossen.

[0009] Der Einfrierzyklus läuft in diesen Anlagen folgendermassen ab: Um Druckanstieg und Kühlung zu koordinieren, wird die Hochdruckkammer zuerst für ca. 30 ms mit Ethanol gefüllt, um die korrekte Korrelation von Druckanstieg und Kühlung zu ermöglichen. Dann werden durch einen Hochdruckzylinder ca. 100 -160 ml kalter flüssiger Stickstoff in 300-600 ms durch die Druckkammer geleitet. Die Druckkammer weist einen Auspuff auf, dessen Durchmesser wesentlich kleiner als die Zuleitung dimensioniert ist. Der Druck wird durch Stauung an diesem Auspuff aufgebaut. Würde die Druckkammer nicht in der geschilderten Art vorgängig mit Ethanol gefüllt, würde die Probe gefroren, bevor sie unter Druck gesetzt wurde. Ethanol in der Druckkammer ist notwendig für die korrekte Abstimmung von Druckaufbau und Kühlung. Nachteilig wirkt sich dabei aus, dass Ethanol in die Probe diffundieren und darin Artefakte bilden kann. Zudem werden nach dem geschilderten Verfahren Suspensionen oft aus den Metallhalbschalen ausgeblasen.

[0010] Reproduzierbare Resultate werden dadurch erreicht, dass die Halbschalen in 1-Hexadecen getaucht mit der biologischen Probe bestückt werden. 1-Hexadecen weist gegenüber wässrigen Lösungen folgende Vorteile auf: Es können ausserhalb der Probe keine Eiskristalle entstehen; die kleine Oberflächenspannung vermeidet Gasblasen zwischen den Halbschalen, welche beim Druckaufbau kollabieren würden. Da 1-Hexadecen mit Wasser nicht mischbar ist, wird die wässrige Probe während der Präparation nicht verändert. Der Gefrierpunkt liegt bei 4°C, erhöht sich jedoch unter Druck (2000 atm.) auf ca. 25°C, wodurch sich eine feste, jedoch nicht rigide "Schale" um die wässrige Probe bildet. Diese "Schale" ist wichtig um während des Abkühlprozesses unter hohem Druck die Proben nicht zu verlieren, da der Stickstofffluss eine Geschwindigkeit von mehr als 40m/s aufweist (STUDER D., MICHEL M. und MÜLLER M. High pressure freezing comes of age, Scanning Microscopy Supplément 3, Vol. 189, S. 253-269).

[0011] Allerdings sind biologische Proben in der Form von Suspensionen mit dieser Technik unter Verwendung von 1-Hexadecen immer noch schwierig zu handhaben. Deshalb wurden für die Aufnahme der biologischen Proben vorzugsweise Zellulosekapillaren von ca. 200 µm innerem Durchmesser und 10 bis 15 µm Wandstärke der porösen Wand eingesetzt, welche in Stücke

von ca. 2 mm Länge zugeschnitten, zwischen die metallischen Halbschalen gelegt und leicht eingeklemmt werden. Diese Zellulosekapillaren sind im Probenhalter von 1-Hexadecen umgeben. Die Proben werden, wie bereits dargestellt, in einer Druckkammer nach dem Stand der Technik gefroren und können nach dem Frieren aus den dünnwandigen, metallenen Halbschalen, die als Probenhalter dienen,

5 manuell herausgenommen werden. (H. HOHENBERG, K. MANNWEILER, M. MÜLLER, High-pressure freezing of cell suspensions in cellulose capillary tubes, Journal of Microscopy 175 (1294), 34-43, insbesondere Fig. 1 S. 35).

[0012] Der Nachteil derartiger Probenaufnehmer aus metallischen Halbschalen besteht darin, dass die Manipulation der gefrorenen Proben, insbesondere ihr Entfernen aus dem festen 1-Hexadecen, schwierig ist und häufig zur Beschädigung oder zum Verlust von Proben führt. Daneben eignen sie sich aufgrund ihrer Geometrie nicht für die apparativ einfachere und dadurch kostengünstigere Druckübertragung auf die Probe durch einen getrennten Kreislauf für die Druckübertragungsflüssigkeit, wie er beispielsweise in DE-PS 1 806 741 beschrieben ist.

[0013] Die Aufgabe der vorliegenden Erfindung bestand dementsprechend darin, Probenhalter für die Aufnahme von wasserhaltigen Proben, insbesondere in Kapillaren aus Zellulose oder anderen Werkstoffen, zu konstruieren, welche für eine Verwendung im Rahmen von Hochdruckgefrierapparaturen mit getrennten Kreisläufen von Druckübertragungs- und Kühlmittel geeignet sind und eine leichte und sichere Manipulation der gefrorenen Proben, insbesondere bei deren Entnahme aus dem Probenhalter, gewährleisten. Zu diesem Zweck war es erforderlich, Probenhalter zu konstruieren, welche

- (-) hohe Abkühlgeschwindigkeiten auf die Probe übertragen,
- 40 (-) ein schnelles Einfrieren unter hohem Druck ohne Unfallrisiko für das Bedienungspersonal ermöglichen,
- (-) auf einfache Weise mit den Kapillaren aus Zellulose oder anderen Werkstoffen bestückt werden können,
- (-) ein leichtes und sicheres Manipulieren der gefrorenen Probe, namentlich beim Entfernen der Kapillaren aus dem Probenhalter ermöglichen.

50 [0014] Die Aufgabe wird durch Probenhalter nach dem Kennzeichen des Patentanspruchs 1 sowie durch ein Verfahren zu deren Verwendung nach dem Kennzeichen des Patentanspruchs 10 gelöst.

[0015] Der erfindungsgemäße Probenhalter besiegt den Nachteil schlecht weiter verarbeitbarer gefrorener Proben. Er ermöglicht es, die gefrorenen Proben auf einfache und sichere Weise allen bekannten Weiterverarbeitungsmethoden (Gefrierätzung, Gefriertrocknung,

Gefriersubstitution, Gefrierschneiden, usw.) zuzuführen.

[0016] Der erfindungsgemäße Probenhalter eignet sich für die Anwendung in Apparaturen, welche einen getrennten Kreislauf von Druckübertragungs- und Kühlmittel aufweisen, entsprechend den Apparaturen nach der deutschen Patentschrift DE-PS 1 806 741. Dies ermöglicht eine Verwendung in relativ kleinen und kostengünstigen Apparaturen für das Hochdruckeinfrieren. Dadurch verringert sich das Betriebsrisiko des Hochdruckeinfrierens beträchtlich, da diese kleinen Apparaturen mit einem Volumen des Druckübertragungsmittels von weniger als 1ml auskommen, während die Apparaturen, welche flüssigen Stickstoff sowohl als Druckübertragungs- als auch als Kühlmittel einsetzen, mit den Probenhaltern nach dem Stand der Technik mindestens 100ml Druckübertragungsmittel benötigen. Beim Einsatz der erfindungsgemäßen Probenhalter in den Apparaturen mit getrenntem Kreislauf von Druckübertragungs- und Kühlmittel würde daher bei einem Unfall eine rund hundertmal kleinere Druckmittelmenge als in den Apparaturen mit flüssigem Stickstoff als Druckübertragungs- und Kühlmittel freigesetzt, welche nur sehr geringen Schaden anrichten dürfte.

[0017] Mit den erfindungsgemäßen Probenhaltern wird die Voraussetzung geschaffen, das Einfrieren von Proben unter hohem Druck für die Licht- und Elektronenmikroskopie erfolgreich in Medizin und Biologie anzuwenden. Das breite Spektrum von Proben, die mit den erfindungsgemäßen Probenhaltern unter hohem Druck kostengünstig gefroren werden können, dürfte die Anwendungsmöglichkeiten der Hochdruck-Einfrier-Methode in den Naturwissenschaften (Ultrastrukturbeschreibung) noch wesentlich erweitern. Das Hochdruck-Einfrieren von verhältnismässig dikken Proben erscheint besonders vorteilhaft für Anwendungen in der Pathologie, da mit dem für dicke Proben beschriebenen Probenhalter qualitativ gute histologische Schnitte für die Diagnose in kürzester Zeit, etwa während einer laufenden Operation, hergestellt werden können.

[0018] Im folgenden werden bevorzugte Ausführungsformen der erfindungsgemäßen Probenhalter sowie deren Verwendung anhand von Zeichnungen beispielhaft dargestellt. Dabei zeigen:

- Fig. 1-A einen Längsschnitt eines Probenhalters, der aus einem massiven, metallischen, gut wärmeleitenden Rohr besteht;
- Fig. 1-B einen vergrösserten Querschnitt eines Probenhalters gemäss B-B in Fig. 1-A;
- Fig. 1-C eine vergrösserte Einzelheit gemäss Ausschnitt C in Fig. 1-A;
- Fig. 2-A einen Längsschnitt eines Probenhalters für zylindrische, dünne Proben mit einem Innendurchmesser im Bereich von 0.3mm;
- Fig. 2-B einen Querschnitt des Probenhalters gemäss B-B in Fig. 2-A;
- Fig. 2-C eine vergrösserte Einzelheit gemäss Aus-

schnitt C in Fig. 2-A;

Fig. 3-A einen Längsschnitt eines Probenhalters für zylindrische, dünne Proben mit einem Innendurchmesser im Bereich von 0.3mm;

5 Fig. 3-B einen Querschnitt eines Probenhalters gemäss B-B in Fig. 3-A;

Fig. 3-C eine vergrösserte Einzelheit gemäss Ausschnitt C in Fig. 3-A;

10 Fig. 4-A einen schematischen Querschnitt durch eine Kühlkammer einer Hochdruckgefrierausrüstung mit einer darin eingesetzten Probenhalterung für zylindrische, dünne Proben;

Fig. 4-B eine vergrösserte Einzelheit gemäss Ausschnitt B in Fig. 4-A

[0019] Der Probenhalter gemäss Fig. 1 weist ein massives, metallisches gut wärmeleitendes äusseres Rohr 1 auf (vorzugsweise aus Kupfer, Innendurchmesser vorzugsweise im Millimeterbereich, Wandstärke

20 entsprechend dem Innendurchmesser, Länge je nach Anforderungen im Bereich zwischen ca. 10 bis 20 mm). Dieses äussere Rohr 1 weist an beiden Stirnseiten eine Ausnehmung 2 auf, welche beispielsweise in der Form eines Konus ausgestaltet sein kann und zur Aufnahme

25 der Anschlüsse für das Druckübertragungsmittel dient. In diesem äusseren Rohr 1 ist ein sehr dünnwandiges inneres Rohr 3 aus einem relativ gut wärmeleitenden Werkstoff, vorzugsweise einem geeigneten Polymer, eingesetzt, dessen Länge vorzugsweise der Länge des

30 äusseren Rohres 1 entspricht, und das mit den zur Weiterverarbeitung von Proben üblichen Werkzeugen geschnitten werden kann. Polymer- und Metallrohr sind durch eine sehr dünne Schicht 4 einer nicht mit Wasser mischbaren Substanz, vorzugsweise eines Kohlenwasserstoffs (z.B. 1-Penten, 1-Chlorbutan, etc.) getrennt,

35 die einen sehr niedrigen Gefrierpunkt (<-120°C) aufweist. Diese Schicht 4 wird dadurch gebildet, dass eine verhältnismässig "dicke", wasserhaltige Probe 5 in das innere Rohr 3 eingebracht, dieses sowie das äusserne

40 Rohr 1 anschliessend in die Flüssigkeit, z.B. den Kohlenwasserstoff 4 eingetaucht werden und schliesslich das mit der Probe gefüllte innere Rohr 3 in das äusserne Rohr 1 eingeschoben wird. Überflüssiger Kohlenwasserstoff tritt an der Gegenseite des äusseren Rohres 1

45 aus und kann dort manuell abgewischt werden. Während des Verfahrens des Hochdruckgefrierens befindet sich die Probe 5 im inneren Rohr 3.

[0020] Der Probenhalter gemäss Fig. 2 eignet sich für zylindrische, "dünne" Proben 6 mit einem Durchmesser

50 vorzugsweise im Bereich von max. 0.3mm. Er weist eine gut wärmeleitende metallische äusserre Kapillare 7 auf, die in einer bevorzugten Ausführungsform aus Kupfer besteht, einen bevorzugten Innendurchmesser im Bereich zwischen 0.1 bis 0.5 mm, vorzugsweise von 0.3 mm, sowie eine bevorzugte Wandstärke im Bereich von

55 0.3 bis 0.5 mm aufweist. Diese äusserre Kapillare 7 ist an beiden Stirnseiten mit je einer Ausnehmung, beispielsweise einem Innenkonus 2, zur Aufnahme der An-

**schlüsse von Leitungen, beispielsweise für ein Druckübertragungsmittel (Hochdruckleitungen) ausgestattet.** Die Ummantelung 8 in der Form eines Hohlzylinders umgibt diese äussere Kapillare 7 und stellt einen integralen Bestandteil des Probenhalters dar. Sie ist vorzugsweise aus rostfreiem Stahl hergestellt und weist in ihrem mittleren Teil eine Ausnehmung in der Form eines Schlitzes 9 quer zur Hauptachse sowie in axialer Richtung eine Bohrung mit einem Durchmesser entsprechend dem Aussendurchmesser der äusseren Kapillare 7 auf. Die äussere Kapillare 7 wird formschlüssig in diese Ummantelung 8 gepresst. Diese Ummantelung 8 gestattet ein einfaches Manipulieren der Probenhalter, verhindert das Knicken der dünnen Metallkapillaren beim Einspannen in die Hochdruckgefrieranlage und erlaubt es, die Proben nach Abschluss des Einfrierzyklus problemlos aus der Apparatur zu entfernen, da ein Klemmen durch deformierte Kapillarenden sicher verhindert wird.

[0021] Während des Hochdruckgefrierens befindet sich eine wasserhaltige, dünne Probe 6, welche ihrerseits in eine innere Kapillare 10 aus einem porösen Polymerwerkstoff gefüllt ist, im Innenraum der äusseren Kapillare 7. Der Polymerwerkstoff soll einerseits porös sein und anderseits mit den zur Weiterverarbeitung von biologischen Proben üblichen Werkzeugen geschnitten werden können. Beispielsweise erfüllen innere Kapillaren aus poröser Zellulose, wie sie in Blutdialyse-Einheiten verwendet werden, diese beide Kriterien. In einer bevorzugten Ausführungsform weist eine derartige innere Kapillare 10 einen Innendurchmesser im Bereich von 0.1 bis 0.5 mm sowie eine Wandstärke im Bereich von 0.01 bis 0.1 mm auf. Der Innenraum der äusseren Kapillare 7 wird durch Eintauchen in eine nicht mit Wasser mischbare Flüssigkeit 4, vorzugsweise einem Kohlenwasserstoff bzw. einem halogenierten Kohlenwasserstoff (z.B. 1-Penten, 1-Chlorbutan, usw.), der einen niedrigen Gefrierpunkt aufweist (<-120°C), aufgefüllt. Die mit der wasserhaltigen Probe (6) gefüllte innere Kapillare (10) wird anschliessend in diesen Innenraum der äusseren Kapillare 7 eingeführt.

Dadurch werden die innere Kapillare 10 aus dem porösen Werkstoff und die äussere Kapillare 7 durch eine dünne Schicht der Substanz 4, vorzugsweise eines Kohlenwasserstoffs voneinander getrennt.

[0022] Die vorzugsweise eingesetzten Zellulosekapillaren stammen beispielsweise aus Blutdialyse-Einheiten. Sie sind polyvalent einsetzbar und ermöglichen es, kleine Organismen (z.B. Nematoden), Einzeller, Mikroorganismen, aber auch Gewebe-Mikrobiopsien (Hirn, Leber, etc.), sowie Gele, Suspensionen usw. unter hohem Druck zu frieren.

[0023] Der Probenhalter gemäss Fig. 3 eignet sich ebenfalls für zylindrische, verhältnismässig dünne Proben 6 mit einem Durchmesser im Bereich von max. 0.3mm und besteht aus einer gut wärmeleitenden äusseren Kapillare 7 (vorzugsweise aus Kupfer), die an ihren Stirnseiten mit je einer Ausnehmung 2, beispiels-

weise in der Form eines Konus, zur Aufnahme der Anschlüsse für das Druckübertragungsmittel versehen ist.

[0024] Im Unterschied zum Probenhalter aus Fig. 2 ist die äussere Kapillare 7 an ihren beiden Stirnseiten mit je einer Ummantelung in der Form eines Hohlzylinders 11, vorzugsweise aus rostfreiem Stahl ummantelt, welche einen integralen Bestandteil des Probenhalters darstellt und zusammen mit diesem manipuliert werden. Der Unterschied zur Ummantelung 8 aus Fig. 2 besteht

darin, dass die Abkühlung der Probe effizienter ist, der Probenhalter jedoch insgesamt weniger stabil ist. Die wasserhaltige Probe 6 im Innern der äusseren Kapillare 7 ist in eine innere Kapillare 10 der beschriebenen Art aus einem porösen Polymerwerkstoff gefüllt. Die äusseren Kapillaren und die innere Kapillare aus dem porösen Werkstoff sind in der gleichen Art wie für die Probenhalter aus Fig. 1 und 2 beschrieben durch eine Schicht einer nicht mit Wasser mischbaren Substanz 4, vorzugsweise eines Kohlenwasserstoffes bzw. halogenierten

Kohlenwasserstoffs (z.B. 1-Penten, 1-Chlorbutan, etc.) getrennt, welcher einen sehr niedrigen Gefrierpunkt (<-120°C) aufweist und eine optimale Wärmeleitung zwischen Probe 6 und äusserer Kapillare 7 gewährleistet.

[0025] Die Länge der äusseren Kapillare 7 kann derart gewählt werden, dass diese entweder innerhalb der Ummantelung 8 bzw. 11 oder bündig mit deren Frontfläche endet (Fig. 2-A und 3-A) oder mit einem oder beiden Enden aus der Ummantelung herausragt. Das äusserste Rohr 1 oder die Ummantelung 8 bzw. 11 kann

an ihrer Außenfläche mit einer Ausnehmung in der Form einer Ringnut versehen sein. Diese Ausnehmung dient dazu, das äusserste Rohr 1 bzw. die Ummantelung 8 bzw. 11 und damit die äusseren Kapillare 7 an einer vorbestimmten Stelle in einem Probenhalteraufnahmegerät 13 einer Untersuchungsanlage, beispielsweise einer Hochdruckgefrieranlage, zu verankern.

[0026] Das Verfahren zur Verwendung der erfundungsgemässen Probenhalter zum Zwecke des Hochdruckgefrierens wasserhaltiger Proben weist die nachfolgenden Verfahrensschritte auf. Für die verhältnismässig "dicken" Proben der Fig. 1 wird das gleiche Verfahren angewendet; die Manipulationen sind jedoch einfacher auszuführen, da die Dimensionen grösser sind. Die wasserhaltigen Proben 6, vorzugsweise aus biologischem Material, werden folgendermassen in die porösen inneren Kapillaren 10 und die äusseren Kapillare 7 eingebbracht: Die inneren Kapillaren 10, vorzugsweise aus poröser Zellulose, werden in an sich bekannter Weise mit einem geeigneten Klebstoff in Pipettenspitzen aus Kunststoff (Spitzen von sogenannten Eppendorf ®-Mikropipetten) geklebt. Durch Aufsetzen dieser Spitzen auf eine Mikropipette von entsprechender Grösse wird die Probe unter Beobachtung durch eine Stereolupe entweder durch Ausnutzung der Kapillarkräfte oder durch leichtes Ansaugen in die poröse innere Kapillare 10 eingefüllt. Bei den heute verwendeten Biopsienadeln muss das mikrobiopsierte Gewebe vor dem Aufsaugen der Länge nach mit einer Rasierklinge oder einem an-

deren geeigneten Instrument geteilt werden.

[0027] Unter Beobachtung durch eine Stereolupe werden die leere äussere Kapillare (7) und die mit der Probe (6) gefüllte innere Kapillare (10) der Probenhalter in eine mit Flüssigkeit 4, vorzugsweise einem nicht mit Wasser mischbaren Kohlenwasserstoff bzw. halogenierten Kohlenwasserstoff mit tiefem Schmelzpunkt gefüllte Petrischale gelegt, wodurch sich die Innenräume der äusseren Kapillaren 7 mit der Flüssigkeit auffüllen. Ein auf dem Boden der Petrischale liegendes Filterpapier dient zum Entfernen überschüssiger Probenflüssigkeit an der Oberfläche der mit der Probe 6 gefüllten inneren Kapillare 10 aus porösem Werkstoff. Die derart von überschüssiger Probenflüssigkeit befreite innere Kapillare 10 wird mit Hilfe zweier Pinzetten oder anderer geeigneter Instrumente manuell in die äussere Kapillare 7 eingeführt. Die Länge der porösen inneren Kapillare 10 sollte dabei der Länge der äusseren Kapillare 7 entsprechen. Dies ist wichtig, da durch den Einfrierzyklus nur derjenige Bereich der Probe 6 in der porösen inneren Kapillare 10 gut gefroren wird, der sich im Bereich der äusseren Kapillare 7 befindet, welcher nicht von der Ummantelung 8 bzw. 11 ummantelt ist. Das Bestücken der Probenhalter mit der Probe 6 sollte nur wenige Sekunden dauern, um Fremdeinflüsse auf die Probe 6 so gering wie möglich zu halten. Die bestückten Probehalter werden unverzüglich eingefroren.

[0028] Das Verfahren zum Einfrieren der erfindungsgemässen Probenhalter unter hohem Druck wird in der Fig.4 an einem Probenhalter 12 gemäss Fig. 3 erläutert, gilt jedoch sinngemäss auch für die Probenhalter, die in Figur 1 und 2 dargestellt sind. In Fig.4 wird der Probenhalter 12 in einen Probenhalteraufnehmer 13 an sich bekannter Konstruktion eingesetzt und mittels eines O-Ringes 14 festgeklemmt. Ist das äussere Rohr 1 oder die Ummantelung 8 bzw. 11 an ihrer Aussenfläche mit einer Ringnut ausgestattet, so wird der Probenhalter 12 mittels einer an sich bekannten Konstruktion durch einen Querbolzen, welcher durch eine Bohrung im Probenhalteraufnehmer 13 eingeführt wird und in die Ringnut passt, an einer vorbestimmten Stelle des Probenhalteraufnehmers 13 befestigt. Anschliessend wird der gefüllte Probenhalteraufnehmer 13 in den dafür vorgesehenen zentrierten Bohrungen 15 einer Hochdruckgefrieranlage eingeführt. Die beiden Ummantelungen 11 des Probenhalters 12 passen dabei in die zentrierten Bohrungen 15. Die zentrale Partie des Probenhalters 12, entsprechend dem nicht ummantelten Teil der äusseren Kapillare 7, liegt in einem Hohlraum 16, der von einem Schlitz der zylindrischen Führung 17 gebildet wird. Dieser ist notwendig, um möglichst grosse Volumina des Kühlmittels (K) pro Zeiteinheit auf den Probenhalter 12 aufzutreffen zu lassen.

[0029] Der Probenhalter wird anschliessend an den Kreislauf des Druckübertragungsmittels angeschlossen: Die äussere Kapillare 7 des Probenhalters 12 wird an ihrem einen Ende durch einen massiven Konus 18, mit einer bestimmten Kraft (F), welche beispielsweise

durch einen Pressluftzylinder 19 erzeugt wird, an die konische Öffnung einer Hochdruckleitung 20 gepresst. Der Konus 18 kann auch durch eine in einem Schraubengewinde des Probenhalteraufnehmers 13 bewegliche Schraube gegen die das äussere Rohr 1 bzw. die äussere Kapillare 7 abschliessende, kegelförmige Ausnehmung 2 bewegt werden und dadurch das äussere Rohr 1 bzw. die äussere Kapillare 7 an einem Ende dicht verschlossen werden. Dies ist zweckmässig, wenn die Länge der äusseren Kapillare 7 so gewählt wird, dass eines ihrer Enden über die Ummantelung 8 bzw. 11 in die zentrale Bohrung 15 des Probenhalteraufnehmers 13 hinausragt. Die Probe 6 wird nun dicht mit dem Hochdrucksystem, d.h. der konisch zugespitzten Hochdruckleitung 20 verbunden und in den Bohrungen 15 fixiert. Die mit einem Druckübertragungsmittel, beispielsweise Hydrauliköl 21, gefüllte Hochdruckleitung 20, welche mit einem Druckgenerator 22 verbunden ist, setzt die Probe 6 im gewünschten Zeitpunkt unter den gewählten hohen Druck und diese wird anschliessend eingefroren.

[0030] Das Kühlmittel wird durch eine massive, nicht dargestellte Zuführung, die den Hohlraum 16 vollständig umgibt, kurzzeitig auf die äussere Kapillare 7 umgelenkt. Durch mechanische Kopplung der Kühlmittelausleitung und der Auslösung der Arretierung des Druckkolbens 23 werden innerhalb eines Zeitraums im Bereich von 0.10 bis 50 msec, vorzugsweise unter 20 msec, beispielsweise um 10 msec, Druckwerte im Bereich zwischen 1000 und 3000 bar, vorzugsweise in einem Bereich zwischen 1600 und 2045 bar in der Probe 6 erreicht. Synchron dazu wird eine Abkühlung im Bereich zwischen 50 (fünfzig) und  $10^6$  (1 Million) °K/sec, vorzugsweise von einigen 1000 °K/sec, an der Oberfläche der äusseren Kapillare 7 erzielt. Dadurch ergibt sich in der Probe 6 eine Temperatur im Bereich zwischen -90 und -196 °C, wodurch diese ein gefroren wird. Die in Fig. 1 dargestellten verhältnismässig "dicken" Proben können zweckmässigerweise auch mit kleineren Abkühlgeschwindigkeiten (unter 5000 °K/sec) eingefroren werden. Zum Abkühlen wird ein kommerziell erhältliches Kühlmittel, vorzugsweise ein Kohlenwasserstoff mit niedrigem Siedepunkt, beispielsweise Propan, eingesetzt, welches in einem Metalltank gelagert wird, welcher von aussen mit flüssigem Stickstoff auf eine Temperatur von ca. -180 °C vorgekühlt wird.

[0031] Unmittelbar nach dem Einfrieren der Probe 6 wird der Pressluftkolben 24 des Pressluftzylinders 19 zurückgezogen und die Probe 6 im Probenhalter 12 mit Hilfe des Handgriffes 25 am Probenhalteraufnehmer 13 aus der Hochdruckgefrieranlage entnommen und bei Atmosphärendruck unverzüglich in flüssigen Stickstoff getaucht. Unter flüssigem Stickstoff wird der Probenhalter 12 mit Hilfe einer Pinzette manuell aus dem Probenhalteraufnehmer 13 entnommen. Der Probenhalter 12 wird bis zur weiteren Verarbeitung der Probe 6 in flüssigem Stickstoff aufbewahrt.

[0032] Die nunmehr gefrorene Probe 6 wird folgendermassen aus dem Probenhalter 12 entfernt: Der Pro-

benhalter 12 wird unter flüssigem Stickstoff in einen Kryostaten gebracht. Bei der Temperatur des Kryostaten (im Bereich von - 90 bis - 140 °C , beispielsweise -120°C) schmilzt der Kohlenwasserstoff 4 (z.B. 1-Penten mit einem Schmelzpunkt von -165°C), der die *innere Kapillare* 10 umgibt. Dadurch lassen sich mit Hilfe eines gekühlten (im Bereich um -120°C) Zylinders, vorzugsweise eines metallischen Instruments, zum Beispiel eines Bohrers mit entsprechendem Durchmesser, die gefrorenen *inneren Kapillaren* 10 aus dem porösen Polymerwerkstoff unter Beobachtung durch eine Stereolupe aus der äusseren *Kapillare* 7 manuell herausschieben. Die derart entnommene *innere Kapillare* 10 mit der Probe 6 kann wiederum in flüssigem Stickstoff gelagert oder weiterverarbeitet werden. Anschliessend wird die Probe 6 in den *inneren Kapillaren* 10 der weiteren Verarbeitung nach einer der an sich bekannten Methoden zugeführt. Die *innere Kapillare* 10 aus dem porösen Polymerwerkstoff, vorzugsweise aus poröser Zellulose, stört dabei nicht, insbesondere bildet sie kein Hindernis für das Schneiden der Probe. Gleicher gilt für die Manipulation der verhältnismässig "dicken" Proben 5. Das dünnwandige *innere Rohr* 3 des Probenhalters aus Fig. 1, erlaubt ebenfalls jede Art der Weiterverarbeitung.

## Patentansprüche

1. Probenhalter für wasserhaltige Proben, vorzugsweise für das Gefrieren unter hohem Druck, bestehend aus einem Aufnehmer aus einem gut wärmeleitenden, vorzugsweise metallischen Werkstoff, und einem Rezipienten in der Form eines Hohlzylinders aus einem schnittfähigen Werkstoff zur Aufnahme einer Probe, wobei der Raum zwischen diesem Rezipienten und der Innenwand des Aufnehmers zur Aufnahme einer Schicht (4) eingerichtet ist, welche bei Raumtemperatur flüssig ist, dadurch gekennzeichnet, dass
    - (a) der Aufnehmer als Hohlzylinder ausgestaltet ist,
    - (b) aus einem einzigen, zur Aufnahme eines Innendruckes im Bereich zwischen 1000 und 3000 bar tauglichen Werkstück besteht,
    - (c) an seinen beiden Stirnseiten je eine Ausnehmung (2) zum Anschliessen von Druckübertragungsleitungen aufweist,
    - (d) einen ebenfalls zylinderförmigen Innenraum zur Aufnahme des Rezipienten mit der Probe (5, 6) aufweist, und
    - (e) dass dieser zylinderförmige Innenraum an beiden Stirnseiten Öffnungen für die Manipulation der Probe (5, 6) und die Veränderung des Druckes in der Probe (5, 6) aufweist.
  2. Probenhalter nach Patentanspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass der Aufnehmer ein äusseres

- einem Kohlenwasserstoff mit einem Gefrierpunkt unter - 120°C, vorzugsweise aus 1-Penten oder 1-Chlorbutan besteht.*
10. Verfahren zur Verwendung des Probenhalters nach Anspruch 1 für das Gefrieren wasserhaltiger Proben unter hohem Druck, dadurch gekennzeichnet, dass
- (a) die wasserhaltige Probe (5, 6) in einen Rezipienten aus einem schnittfähigen Werkstoff eingefüllt wird,
  - (b) der zylindrische Innenraum eines metallischen Aufnehmers mit einer bei Raumtemperatur flüssigen Substanz (4) aufgefüllt wird,
  - (c) der mit der Probe (5, 6) gefüllte Rezipient manuell in den Innenraum des Aufnehmers eingeführt wird, wodurch die Substanz (4) eine Zwischenschicht zwischen dem Rezipienten und der Innenwand des Aufnehmers bildet,
  - (d) der derart gefüllte Aufnehmer an den Druckübertragungskreislauf einer an sich bekannten Hochdruckgefrieranlage mit zwei getrennten Kreisläufen für die Kühlung und die Druckübertragung angeschlossen wird,
  - (e) der Innenraum des Aufnehmers mit der Probe (5, 6) kurzzeitig unter hohen Druck gesetzt wird, wobei die Druckübertragung durch ein Druckübertragungsmedium unmittelbar in den Innenraum des Aufnehmers erfolgt, der Druck ausserhalb des Aufnehmers hingegen nicht verändert wird,
  - (f) die Probe (5, 6) im Innenraum des Aufnehmers durch Einwirkung eines Kühlmittels von aussen auf die Wand des Aufnehmers kurzzeitig stark abgekühlt und dadurch eingefroren wird,
  - (g) der Druck im Innenraum des Aufnehmers mit der Probe (5, 6) wieder auf den Wert des atmosphärischen Druckes gesenkt wird,
  - (h) die Probe (5, 6) im Aufnehmer auf eine Temperatur gebracht wird, bei der die gefrorene Zwischenschicht (4) schmilzt,
  - (i) die im Rezipienten aus schnittfähigen Werkstoff befindliche Probe (6) durch Einführen eines entsprechend dimensionierten Instruments an der Stirnseite des Aufnehmers manuell aus dem Innenraum des Aufnehmers hinausgestossen und
  - (j) in diesem Zustand der weiteren Verarbeitung zugeführt wird.
11. Verfahren nach Patentanspruch 10, dadurch gekennzeichnet, dass die innere Kapillare (10) aus einem porösen Polymerwerkstoff, vorzugsweise aus poröser Zellulose, gefertigt ist und die Probe (6) durch Kapillarkräfte in diese innere Kapillare (10) gefüllt wird.
12. Verfahren nach Patentanspruch 10, dadurch gekennzeichnet, dass die innere Kapillare (10) aus einem porösen Polymerwerkstoff, vorzugsweise poröser Zellulose, gefertigt ist und die Probe (6) durch Ansaugen in diese innere Kapillare (10) gefüllt wird.
13. Verfahren nach Patentanspruch 10 bis 12, dadurch gekennzeichnet, dass die Flüssigkeit (4) der Zwischenschicht im Innenraum des Aufnehmers ein nicht mit Wasser mischbarer Kohlenwasserstoff bzw. halogenierter Kohlenwasserstoff mit tiefem Schmelzpunkt ist.
14. Verfahren nach Patentanspruch 10 bis 13, dadurch gekennzeichnet, dass der gewählte Druckwert innerhalb von 0.10 bis 50 msec, vorzugsweise weniger als 20 msec, in der Probe (5, 6) aufgebaut wird.
15. Verfahren nach Patentanspruch 10 bis 14, dadurch gekennzeichnet, dass der Druckwert in der Probe (5, 6) im Bereich zwischen 1000 und 3000 bar, vorzugsweise zwischen 1600 bis 2045 bar, liegt.
16. Verfahren nach Patentanspruch 10 bis 15, dadurch gekennzeichnet, dass an der Aussenseite des Aufnehmers eine Abkühlungsgeschwindigkeit von 5000 bis  $10^6$  (1 Million) °K/sec und eine Temperatur in der Probe (5, 6) zwischen - 90 und - 196 °C erreicht wird.
17. Verfahren nach Patentanspruch 10 bis 16, dadurch gekennzeichnet, dass als Kühlmittel ein Kohlenwasserstoff mit niedrigem Siedepunkt verwendet wird, der mit flüssigem Stickstoff auf eine Temperatur von - 180 °C vorgekühlt wird..
18. Verfahren nach Patentanspruch 10 bis 17, dadurch gekennzeichnet, dass der Probenhalter (12) nach dem Gefriervorgang auf eine Temperatur im Bereich von - 90 bis - 140 °C gebracht wird, wodurch die Zwischenschicht (4) schmilzt.
19. Verfahren nach Patentanspruch 10 bis 18, dadurch gekennzeichnet, dass der mit der Probe (5, 6) gefüllte Rezipient vor dem manuellen Einführen in den Innenraum des Aufnehmers in eine nicht mit Wasser mischbare Flüssigkeit mit niedrigem Gefrierpunkt vorzugsweise einem Kohlenwasserstoff mit einem Gefrierpunkt unter - 120 °C, vorzugsweise in 1-Penten oder 1-Chlorbutan eingetaucht wird.

## 55 Claims

- A specimen holder for a hydrous specimen, especially for high pressure freezing, comprising a re-

ceiver of a heat conductive material, especially a metal, and a recipient shaped as a hollow cylinder of a material which can be cut, the space between said recipient and an inside wall of the receiver being filled by a layer (4) which is liquid at room temperature, **characterized in that**

- (a) said receiver is a hollow cylinder,
- (b) consisting of one single piece capable to resist an inner pressure within the range of 1000 to 3000 bar,
- (c) including two end faces, each of which include a recess (2) capable of accommodating connecting lines,
- (d) including an equally cylindrical interior space capable of accommodating said recipient containing said specimen (5, 6), and
- (e) said cylindrical interior space comprising at said two end faces openings for manipulating the specimen (5, 6) and for adjusting the pressure inside said specimen (5, 6).

2. A specimen holder as claimed in claim 1, wherein said receiver comprises an exterior tube (1) of a heat conductive material, preferably a metal, having an inside diameter preferably in the range of millimetres, a wall thickness corresponding to that of the inside diameter, and a length in the range from 10 to 20 mm, said recipient receiving the specimen (5) including an interior tube (3) made from a polymer material and being adjusted to fit into said exterior tube (2).
3. A specimen holder as claimed in claim 1, wherein
  - (a) said receiver consists of an exterior capillary (7) made from a heat conductive material, preferably a metal, and
  - (b) said recipient receiving said specimen (6) consists of an interior capillary (10) made from a porous polymer material, preferably from porous cellulose.
4. A specimen holder as claimed in claim 3, comprising a sheathing (8) made from metal, in the form of a hollow cylinder comprising a bore in axial direction for accommodating said exterior capillary (7) and in its central portion a cavity (9) in the form of a slit that is arranged in axial direction thereof.
5. A specimen holder as claimed in claim 3, comprising at said two end faces one sheathing shaped as hollow cylinders (11) capable of receiving said exterior capillary (7) without enclosing it over its entire length.
6. A specimen holder as claimed in claims 3 through 5, wherein said exterior capillary (7) has an inside

diameter in the range from 0.1 to 0.5 mm and a wall thickness in the range from 0.3 to 0.5 mm.

7. A specimen holder as claimed in claims 3 through 5, wherein said interior capillary (10) made from porous polymer material has an inside diameter in the range of 0.1 to 0.5 mm and a wall thickness in the range of 0.01 to 0.1 mm.
- 10 8. A specimen holder as claimed in claims 1 through 7, wherein said layer (4) consists of a water insoluble substance with low melting point.
- 15 9. A specimen holder as claimed in claims 1 through 8, wherein said layer (4) consists of a hydrocarbon with a melting point below - 120 °C, preferably of 1-pentene, or 1-chlorobutane.
- 20 10. A method for freezing hydrous specimens under high pressure using a specimen holder as claimed in claim 1, said method comprising:
  - (a) introducing the hydrous specimen (5, 6) into a recipient made from a material that can be cut,
  - (b) filling the cylindrical interior space of a metallic receiver with a substance (4) which is liquid at room temperature,
  - (c) manually introducing the recipient filled with the specimen (5, 6) into the interior space of the receiver said substance (4) thereby forming an intermediate layer between said recipient and the interior wall of said receiver,
  - (d) connecting said filled receiver to corresponding receiving devices of a pressure transfer circuit of a high-pressure freezing system comprising two separate circuits for freezing and pressure transfer;
  - (e) subjecting said receiver containing said specimen (5, 6) to high pressure for a short time, whereby the pressure transfer is effected by means of a pressure transfer medium immediately into the interior space of the receiver, the pressure outside of said receiver being maintained unchanged;
  - (f) intensely cooling said specimen (5, 6) in the interior space of said receiver for a short time by means of a cooling medium from outside into the wall of said receiver so as to thereby freeze said specimen;
  - (g) subjecting the interior space of said receiver containing said specimen (5, 6) to atmospheric pressure,
  - (h) bringing said specimen (5, 6) in the receiver to a temperature at which the said frozen intermediate layer (4) melts,
  - (i) pushing the specimen (6) filled in the recipient from material that can be cut out of the in-

- L U S S U Z U D I
- 10
- terior space of the receiver by introducing an appropriately dimensioned instrument at the end of said receiver, and  
(j) sending the specimen to further processing if desired.
11. A method as claimed in claim 10, wherein the inner capillary (10) is a capillary made of a porous polymer material, preferably porous cellulose, and the specimen (6) is introduced into said inner capillary (10) by capillary forces. 10
12. A method as claimed in claim 10, wherein the inner capillary (10) is made of a porous material, preferably from porous cellulose, and the specimen (6) is introduced into said inner capillary (10) by suction. 15
13. A method as claimed in claims 10 through 12, wherein the substance (4) in the intermediate layer in the interior space of the receiver comprises a hydrocarbon or halogenated hydrocarbon which is not water-miscible and has a low melting point. 20
14. A method as claimed in claims 10 through 13, wherein a chosen pressure value is built in the specimen (5, 6) within 0.10 and 50 msec, preferably within less than 20 msec. 25
15. A method as claimed in claims 10 through 14, wherein the pressure value in the specimen (5, 6) is in the range between 1000 and 3000 bar, preferably in the range between 1600 and 2045 bar. 30
16. A method as claimed in claims 10 through 15, wherein a cooling rate of 5000 to  $10^6$  (1 million) °K/sec is reached on a surface of the receiver and a temperature between -90 and -196 °C is reached in the specimen (5, 6). 35
17. A method as claimed in claims 10 through 16, wherein a hydrocarbon with a low boiling point, which is precooled with liquid nitrogen to a temperature of -180 °C, is used as the cooling substance. 40
18. A method as claimed in claims 10 through 17, wherein after the cooling step, the specimen holder (12) is brought to a temperature in the range from -90 to -140 °C, whereby the intermediate layer (4) melts. 45
19. A method as claimed in claims 10 through 18, wherein said recipient containing said specimen (5, 6) is immersed prior to being manually introduced into the interior space of the receiver into a non water-miscible liquid with a low melting point, preferably a hydrocarbon with a melting point below -120 °C, preferably into 1-pentene, or 1-chlorobutane. 50
- Revendications**
1. Support pour échantillons hydratés, notamment pour le procédé de congélation sous pression élevée, comprenant un récepteur formé d'un matériel conducteur thermique, notamment un métal, et un récipient en cylindre vide formé d'un matériel capable d'être tranché et destiné à renfermer un échantillon, le volume entre le récipient et la surface intérieure du récepteur étant destiné à être rempli d'une couche (4) liquide à la température ambiante, **caractérisé en ce que**
- (a) le récepteur a la forme d'un cylindre vide,
  - (b) formé d'une seule pièce capable à résister une pression intérieure entre 1000 et 3000 bar,
  - (c) comprenant aux deux parties frontales un recul (2) permettant le rattachement à un système de transfert de pression,
  - (d) comprenant un espace intérieur cylindrique destiné à reprendre le récipient contenant l'échantillon (5, 6), et
  - (e) que cet espace intérieur cylindrique contient aux deux parties frontales des ouvertures destinées à la manipulation de l'échantillon (5, 6) et le réglage de la pression.
2. Support pour échantillons hydratés selon la revendication 1, **caractérisé en ce que** le récepteur possède un tube extérieur (1) formé d'une matière d'une conductivité thermique élevée, notamment un métal, possédant un diamètre intérieur notamment en millimètres, une épaisseur correspondant au diamètre intérieur et une longueur notamment entre 10 et 20 mm, et que le récipient contenant l'échantillon est un tube intérieur (3) formé d'un matériel polymérique introduit dans le tube extérieur (1).
3. Support pour échantillons hydratés selon la revendication 1, **caractérisé en ce que**
- (a) le récepteur est un tuyau capillaire (7) formé d'un matériel d'une conductivité thermique élevée, notamment un métal, et
  - (b) le récipient contenant l'échantillon (6) est un tuyau capillaire intérieur (10) formé d'un matériel polymérique poreux, notamment de cellulose poreuse.
4. Support pour échantillons hydratés selon la revendication 3, **caractérisé en ce qu'il comprend** une couverture (8) formée d'un matériel métallique en forme de cylindre vide possédant un forage en direction axiale pour renfermer le tuyau capillaire extérieur (7) et possédant un recul (9) formé en fente radiale dans sa partie centrale.

5. Support pour échantillons hydratés selon la revendication 3, caractérisé en ce qu'il possède aux deux parties frontaux une couverture en forme de cylindre vide (11) renfermant le tuyau capillaire (7) mais ne couvrant pas la longueur entière de ce dernier.
6. Support pour échantillons hydratés selon l'une des revendications 3 à 5, caractérisé en ce que le tuyau capillaire (7) a un diamètre intérieur entre 0.1 et 0.5 mm et une épaisseur du matériel entre 0.3 et 0.5 mm.
7. Support pour échantillons hydratés selon l'une des revendications 3 à 5, caractérisé en ce que le tuyau capillaire (10) d'un matériel polymérique poreux possède un diamètre intérieur entre 0.1 et 0.5 mm et une épaisseur du matériel entre 0.01 et 0.1 mm.
8. Support pour échantillons hydratés selon l'une des revendications 1 à 7, caractérisé en ce que la couche (4) est une substance insoluble à l'eau et possédant un point de congélation bas.
9. Support pour échantillons hydratés selon l'une des revendications 1 à 8, caractérisé en ce que la couche (4) contient un hydrocarbure avec un point de congélation en dessous de - 120 °C, notamment 1-pentène ou 1-chlorobutane.
10. Procédé utilisant le support pour échantillons selon la revendication 1 pour la congélation des échantillons hydratés sous pression élevée caractérisé en ce que
- (a) l'échantillon hydraté (5, 6) est placé dans un récipient formé d'un matériel capable d'être tranché,
  - (b) l'espace intérieur d'un récepteur métallique est rempli d'une substance liquide à la température ambiante,
  - (c) le récipient rempli de l'échantillon (5, 6) est introduit manuellement dans l'espace intérieur du récepteur la substance (4) formant une couche intermédiaire entre le récipient et la surface intérieure du récepteur,
  - (d) le récepteur ainsi rempli est rattaché aux systèmes de pression d'une installation de congélation à pression élevée possédant deux systèmes séparés pour le réfrigérant et le transfert de pression,
  - (e) l'intérieur du récepteur contenant l'échantillon (5, 6) est mis sous pression élevée pour une période de courte durée le transfert de pression étant réalisé par un moyen de transfert de pression immédiatement à l'intérieur du récepteur la pression à l'extérieur du récepteur
- restant inchangée,
- (f) l'échantillon (5, 6) à l'intérieur du récepteur est réfrigéré instantanément et congelé à l'aide d'un moyen réfrigérant appliqué de l'extérieur à la surface du récepteur,
  - (g) la pression à l'intérieur du récepteur contenant l'échantillon (5, 6) est ajustée à la pression atmosphérique,
  - (h) l'échantillon (5, 6) dans le récepteur est ajusté à une température à laquelle la couche intermédiaire (4) devient liquide,
  - (i) l'échantillon (6) dans le récipient formé de matériel capable d'être tranché est expulsé manuellement hors de l'intérieur du récepteur en introduisant un instrument par la partie frontale du récepteur, et
  - (j) est transféré dans cet état à un traitement ultérieur.
20. 11. Procédé selon la revendication 10 caractérisé en ce que le tuyau capillaire intérieur (10) est formé d'un polymère poreux, notamment de cellulose poreuse, et que l'échantillon (6) est introduit dans ce tuyau capillaire intérieur (10) à l'aide de forces capillaires.
25. 12. Procédé selon la revendication 10 caractérisé en ce que le tuyau capillaire intérieur (10) est formé d'un polymère poreux, notamment de cellulose poreuse, et que l'échantillon (6) est aspiré dans le tuyau capillaire intérieur (10).
30. 13. Procédé selon l'une des revendications 10 à 12 caractérisé en ce que la couche intermédiaire à l'intérieur du récepteur est un hydrocarbure ou un hydrocarbure halogéné insoluble à l'eau et ayant une température de fusion basse.
35. 14. Procédé selon l'une des revendications 10 à 13 caractérisé en ce que la pression choisie est appliquée à l'échantillon dans un délai de 0.10 à 50 msec, notamment moins de 20 msec.
40. 15. Procédé selon l'une des revendications 10 à 14 caractérisé en ce que la pression à l'échantillon (5, 6) est ajustée entre 1000 et 3000 bar, notamment entre 1600 et 2045 bar.
45. 16. Procédé selon l'une des revendications 10 à 15 caractérisé en ce que une vitesse de réfrigération de 5000 à  $10^6$  (1 million) °K/sec est atteinte à la surface du récepteur et une température de l'échantillon (5, 6) entre -90 et -196 °C.
50. 17. Procédé selon l'une des revendications 10 à 16 caractérisé en ce que un hydrocarbure à température de fusion basse est utilisé et réfrigéré par le nitrogène liquide à une température de - 180 °C.

18. Procédé selon l'une des revendications 10 à 17 caractérisé en ce que le support (12) est ajusté après le procédé de congélation à une température entre - 90 et - 140 °C résultant à la fonte de la couche intermédiaire (4). 5

19. Procédé selon l'une des revendications 10 à 18 caractérisé en ce que le récipient contenant l'échantillon (5, 6) est immergé avant d'être introduit à l'intérieur du récepteur dans un liquide insoluble à l'eau et ayant une température de congélation basse, notamment dans un hydrocarbure à température de congélation en dessous de - 120 °C, notamment la 1-pentène ou la 1-chlorobutane. 10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

12

EP 0 853 238 B1

Fig.1A

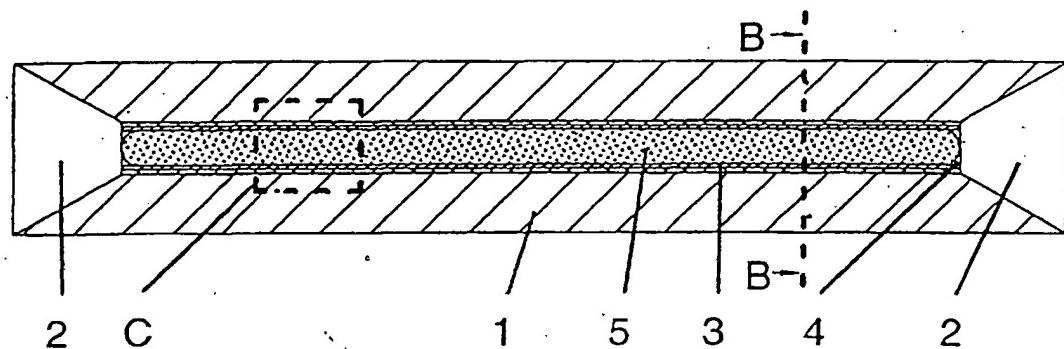


Fig.1B

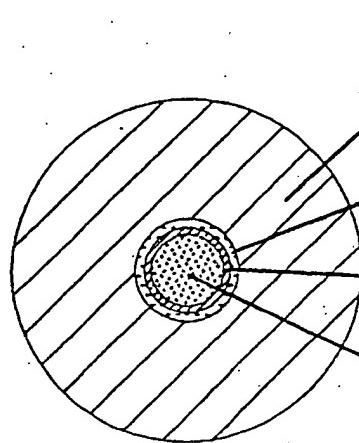


Fig.1C

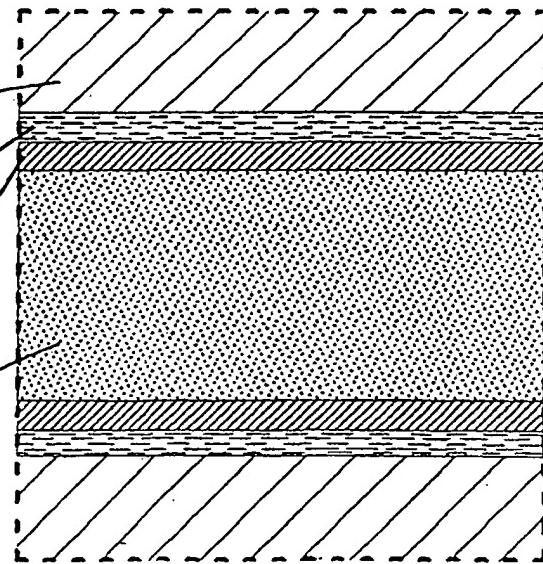


Fig.2A

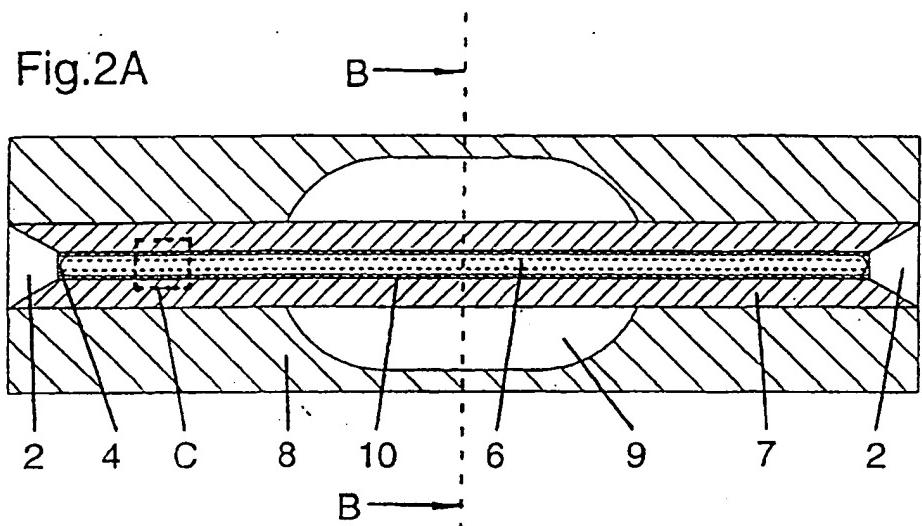


Fig.2B

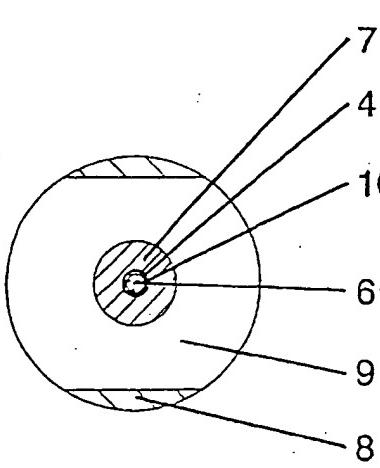
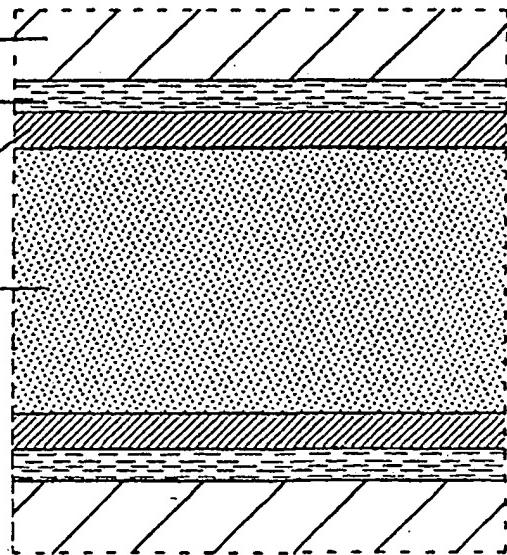


Fig.2C



EP 0 853 238 B1

Fig.3A

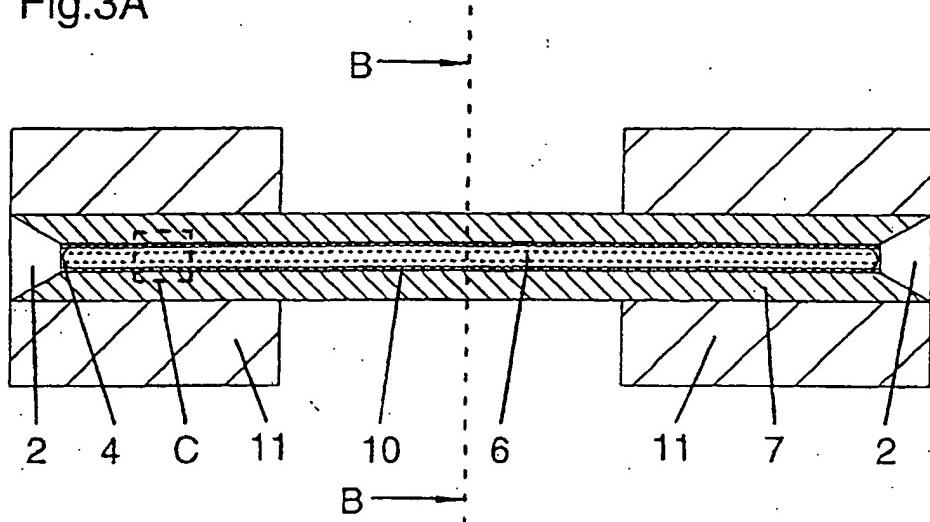


Fig.3B

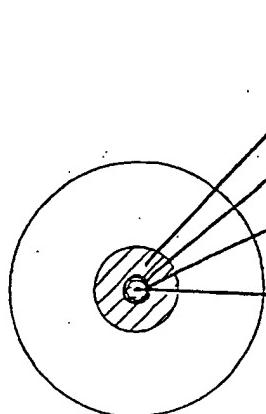


Fig.3C

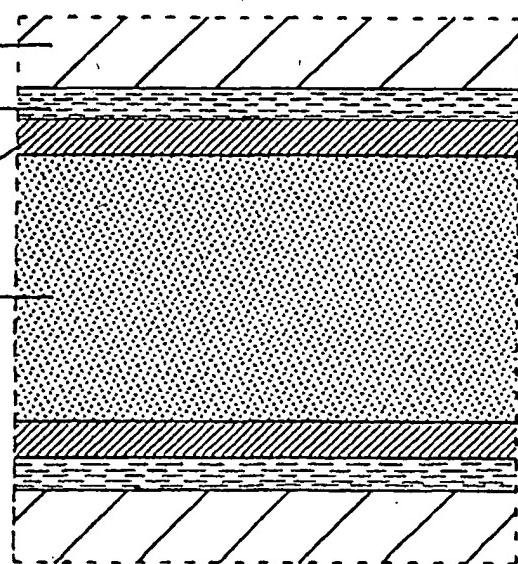


Fig.4A

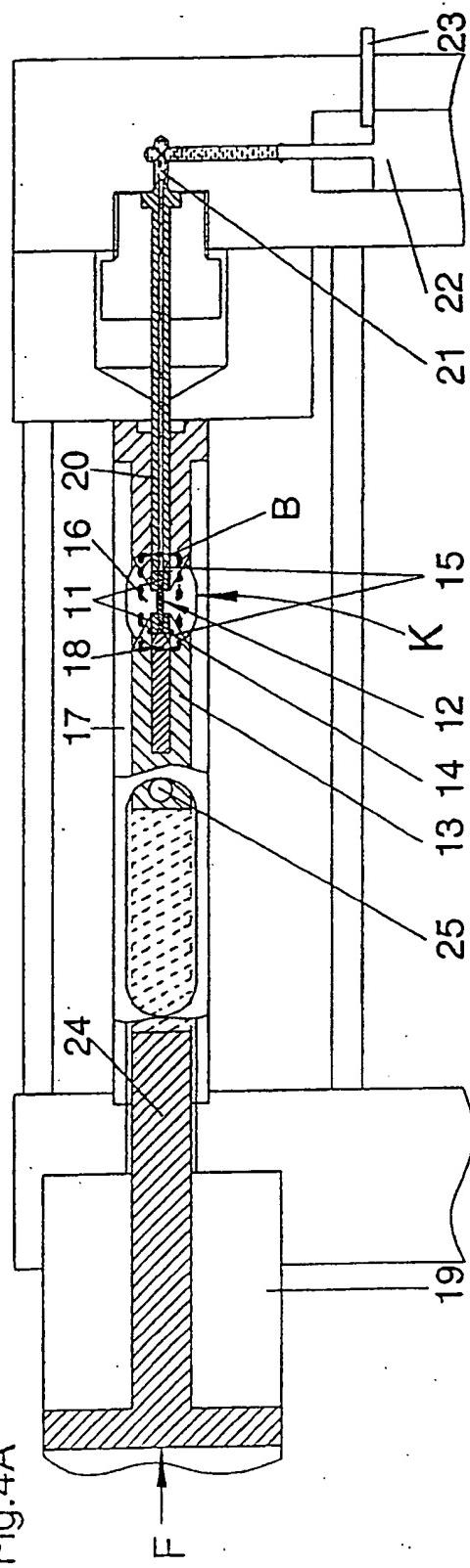
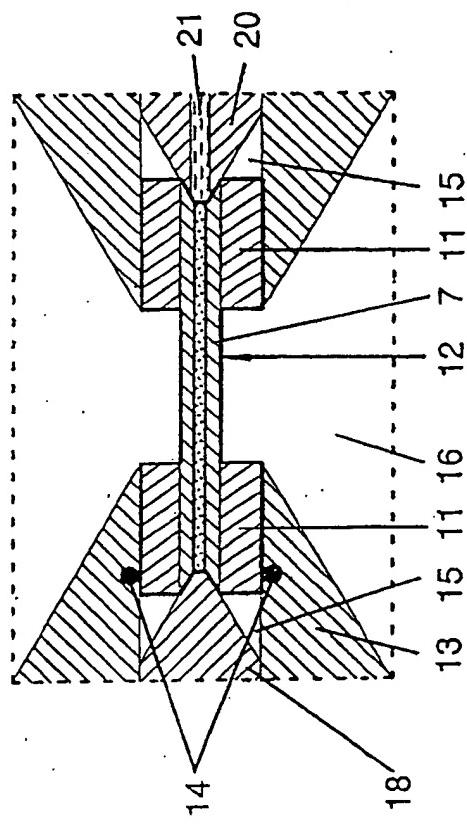


Fig.4B





US 2002010895

AF

(19) United States

(12) Patent Application Publication (10) Pub. No.: US 2002/0108957 A1  
STUDER (43) Pub. Date: Aug. 15, 2002(54) SPECIMEN HOLDERS FOR HYDROUS  
SPECIMENS AND METHOD OF USING  
THEM

## Publication Classification

(51) Int. Cl.<sup>7</sup> ..... A47J 39/00; A47J 41/00;  
B65D 81/38; B65D 83/72;

(76) Inventor: DANIEL STUDER, SCHWEIZ (SE)

(52) U.S. Cl. ..... 220/592.28

Correspondence Address:  
FOLEY & LARDNER  
SUITE 500  
3000 K STREET NW  
WASHINGTON, DC 200075109

## (57) ABSTRACT

( \*) Notice: This is a publication of a continued pros-  
ecution application (CPA) filed under 37  
CFR 1.53(d).

A specimen holder for a hydrous specimen comprising:

(21) Appl. No.: 09/006,387

- (a) an inner hollow cylinder of a heat conductive material,
- (b) an inner hollow cylinder of a material which can be cut,
- (c) a cylindrical interior space within the inner hollow cylinder for receiving the specimen, and
- (d) the space between the inner hollow cylinder and an inside wall of the outer hollow cylinder being filled by a layer which is liquid at room temperature.

(22) Filed: Jan. 13, 1998

(30) Foreign Application Priority Data

Jan. 13, 1997 (CH) ..... 0053/97

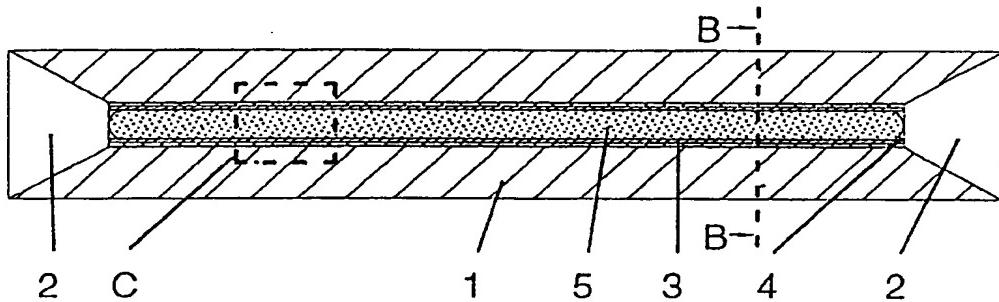


Fig.1A

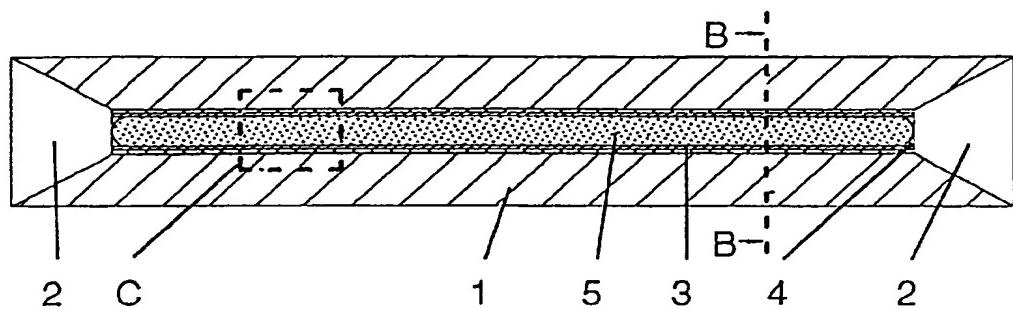


Fig.1B

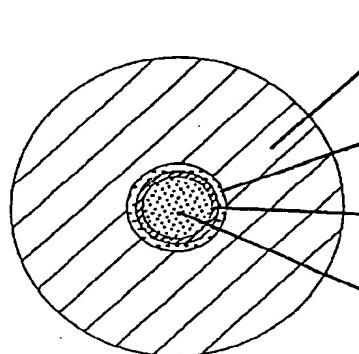


Fig.1C

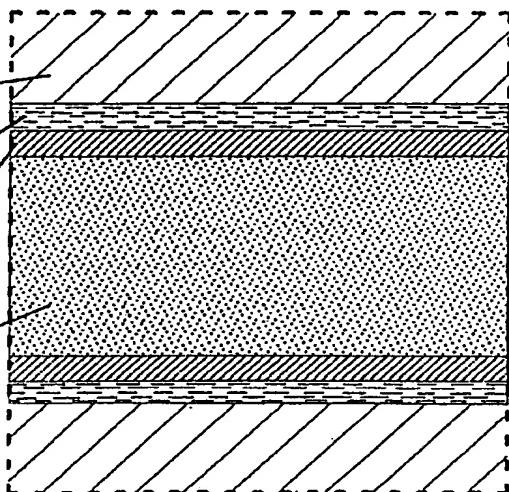


Fig.2A

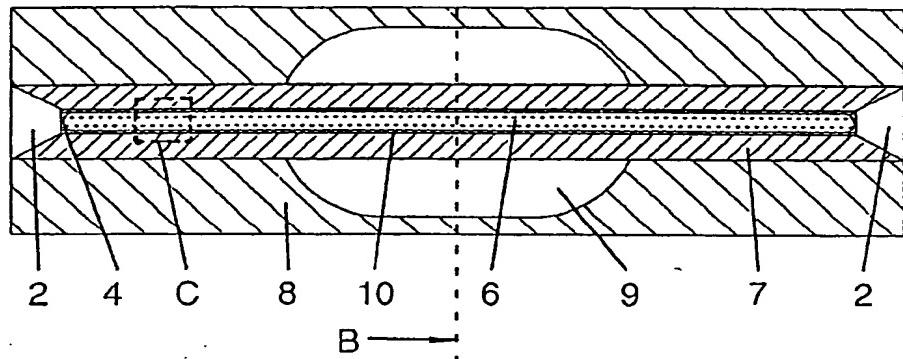


Fig.2B

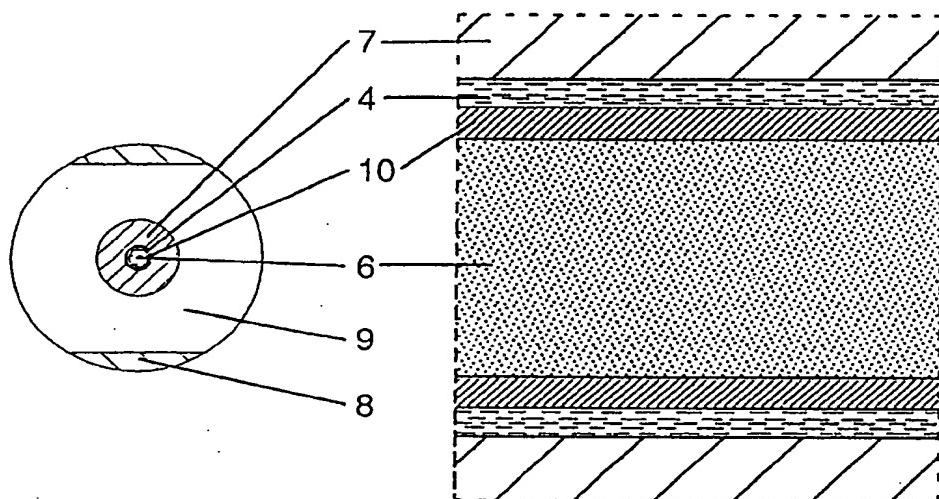


Fig.2C

Fig.3A

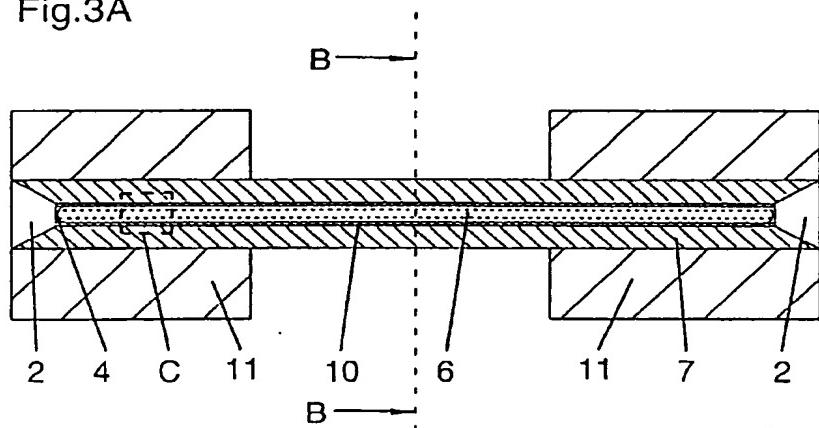


Fig.3B

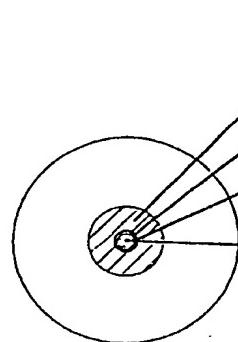
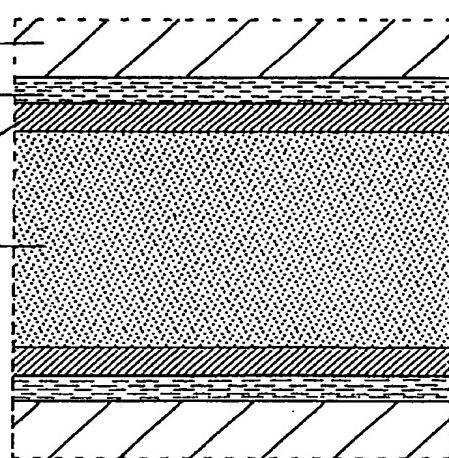
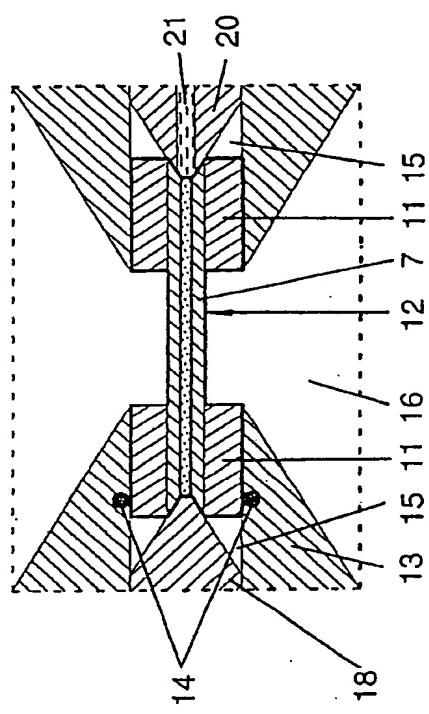
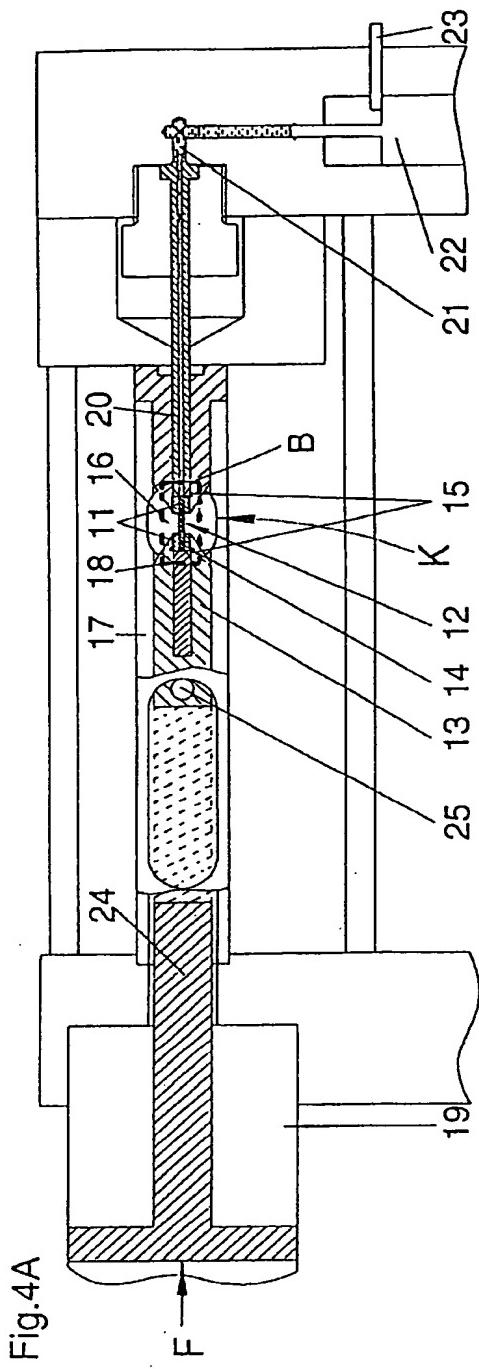


Fig.3C





Aug. 15, 2002

## SPECIMEN HOLDERS FOR HYDROUS SPECIMENS AND METHOD OF USING THEM

### BACKGROUND OF THE INVENTION

[0001] 1. Field of the Invention

[0002] The present invention relates to specimen holders for hydrous specimens, and to methods of using them, and in particular to specimen holders suitable for high-pressure freezing.

[0003] 2. Description of Related Art

[0004] A method of rapidly freezing hydrous specimens under high pressure is generally known, for example, from German Patent DE-B 1 806 741. The advantage of freezing under high pressure as opposed to normal pressure can be explained as follows: if a pressure of about 2000 bar is applied to a specimen during cooling, the cooling rate required for vitrification (no ice crystal formation, no segregations) is reduced by a factor of one hundred, consequently making it possible to vitrify specimens in the form of slices up to a maximum thickness of 200  $\mu\text{m}$ . It should also be noted that, if there is any ice formation under pressure, the mesh size of the segregation patterns becomes greatly reduced, i.e. hydrous specimens about 200  $\mu\text{m}$  thick frozen under 2000 bar are optimally preserved ultrastructurally (nanometer range) (STUDER D., MICHEL M., WOHLWEND M., HUNZIKER E. B. and BUSCHMANN M. D., Vitrification of articular cartilage by high-pressure freezing, J. of Microscopy 179 (1295), 312-332). Thus far, the advantage of high-pressure freezing for relatively thick specimens (specimen thickness in the range of around 2 mm) has not been recognized. The reduction in the mesh size of the segregation patterns has the effect that such specimens appear optimally preserved under a light microscope, since segregations in the  $\mu\text{m}$  range are not visible.

[0005] The specimen holder described in DE-B 1 806 741 is generally poorly suited for further processing of frozen specimens. It is a tubular, thin-walled container made, for example, of copper which is closed at one end and widened at its upper end in the form of a funnel. The specimen inside this specimen holder is subjected to pressure by a hydraulic system using a pressure transfer fluid, for example, water, and is cooled from outside by spraying on a coolant. The use of this device makes it virtually impossible for the specimens to be further processed after freezing. By applying a predetermined breaking point, it has been possible at least to use a so-called freeze etching technique. With this technique, thin metal impressions are prepared, which can be investigated.

[0006] Commercially available high-pressure freezing devices according to the prior art typically operate as follows: they use liquid nitrogen of about -150° C. both as a pressure transfer medium and as a coolant. Its temperature under normal pressure is -196° C.; under 2000 atm, it is solid at this temperature. The apparatus-related disadvantages of such systems, in which liquid nitrogen is used both as a pressure transfer medium and as a coolant, include the following: the machines are relatively large (about 0.8x1.6x 1.5 m<sup>3</sup>) and heavy (>600 kg). Their use entails a risk of accidents for the operating personnel: the spraying on of over 100 ml of liquid nitrogen under 2000 bar requires relatively large bores in the pressure chamber, which accord-

ingly has to be of a very solid construction. Accidents are known; thus far, no instances of personal injury have occurred, but property damage can run into very high FIGS. (5-20,000 Swiss Francs). The costs of these apparatuses continue to be relatively high, since they have to be produced in small numbers from high-grade materials (150-300,000 Swiss Francs).

[0007] In such systems, the biological specimens are generally located in two thin-walled metal half-shells (so-called aluminum sandwich: about 3 mm outside diameter, inside diameter about 2 mm, with a variable cavity thickness of 100-600  $\mu\text{m}$ ), which are securely clamped between two steel plates. These plates are securely bolted to a solid steel impeller (specimen holder). This specimen holder is introduced with the specimen into a high pressure chamber and arrested by a solid transverse bolt. The high pressure chamber is sealed by an O-ring on the specimen holder.

[0008] The freezing cycle in the above-described systems typically proceeds as follows: to coordinate the pressure increase and cooling, the high pressure chamber is initially filled for about 30 ms with ethanol, in order to permit the correct correlation of the pressure increase and the cooling. Then, about 100-160 ml of cold liquid nitrogen is passed by means of a high pressure cylinder through the pressure chamber in 300-600 ms. The pressure chamber has an exhaust, the diameter of which is made much smaller than the feedline. The pressure is built up by accumulation at this exhaust. If the pressure chamber were not previously filled with ethanol in the way described, the specimen would freeze before it were subjected to pressure. Ethanol in the pressure chamber is necessary for the correct correlation of the pressure build-up and cooling. It is disadvantageous in this respect that it is possible for the ethanol to diffuse into the specimen and form artefacts in it or damage it. What is more, when the above-described method is employed, suspensions are often blown out of the metal half-shells.

[0009] It is often possible to achieve reproducible results by the half-shells, provided with the biological specimen, being immersed in 1-hexadecene. 1-hexadecene typically has the following advantages over aqueous solutions: no ice crystals can generally form outside the specimen; the low surface tension avoids gas bubbles, which would collapse during the pressure build-up, between the half-shells. Since 1-hexadecene is not water-miscible, the aqueous specimen is not changed during preparation. The freezing point is 4° C., but increases under pressure (2000 atm) to about 25° C., whereby a solid, but not rigid "shell" forms around the aqueous specimen. This "shell" is important in order not to lose the specimens during the cooling process under high pressure, since the nitrogen flow has a velocity of over 40 m/s (See, for example, STUDER D., MICHEL M. and MÜLLER M. High-pressure freezing comes of age, Scanning Microscopy Supplement 3, Vol. 189, pages 253-269).

[0010] However, biological specimens in the form of suspensions are still often difficult to handle with the technique using 1-hexadecene. Therefore, for receiving the biological specimens, preferably cellulose capillaries of about 200  $\mu\text{m}$  inside diameter and 10 to 15  $\mu\text{m}$  wall thickness of the porous wall have been used, cut into pieces of about 2 mm in length, placed between the metal half-shells and lightly clamped in place. These cellulose capillaries are surrounded by 1-hexadecene in the specimen

Aug. 15, 2002

holder. As already described, the specimens are frozen in a pressure chamber according to the prior art and, after freezing, may be manually removed from the thin-walled, metal half-shells, which serve as specimen holders (See, for example, H. HOHENBERG, K. MANNWEILER, M. MÜLLER, High-pressure freezing of cell suspensions in cellulose capillary tubes, *Journal of Microscopy* 175 (1294), 34-43, in particular FIG. 1, page 35).

[0011] The disadvantage of such specimen holders comprising metal half-shells is that the manipulation of the frozen specimens, in particular their removal from the solid 1-hexadecene, is difficult and often leads to specimens being damaged or lost. In addition, on account of their geometry, they are typically not suitable for the use of a separate circuit for the pressure transfer fluid, which in terms of apparatus is a more simple and therefore less costly means of transferring pressure to the specimen, as is described, for example, in DE-B 1 806 741.

#### SUMMARY OF THE INVENTION

[0012] An object of the present invention was accordingly to design specimen holders for receiving hydrous specimens, in particular in capillaries preferably made of cellulose or other materials. It was also an object to provide specimen holders which are generally suitable for use in high-pressure freezing apparatuses with separate circuits for the pressure transfer medium and coolant and to ensure easy and reliable manipulation of the frozen specimens, in particular during their removal from the specimen holder.

[0013] In accordance with these and other objectives, there is provided a specimen holder for a hydrous specimen comprising: (a) an inner hollow cylinder of a heat conductive material, (b) an inner hollow cylinder of a material which can be cut, (c) a cylindrical interior space within the inner hollow cylinder for receiving the specimen, and (d) the space between the inner hollow cylinder and an inside wall of the outer hollow cylinder being filled by a layer which is liquid at room temperature.

[0014] In yet further accordance with these and other objects, there is provided a method for freezing hydrous specimens under high pressure using a specimen holder, said method comprising: (a) introducing the hydrous specimen into a first hollow cylinder, (b) filling the cylindrical interior space of a second hollow cylinder with a substance which is liquid at room temperature, (c) manually introducing the first hollow cylinder into the interior space of the second hollow cylinder, (d) connecting the second hollow cylinder to corresponding receiving devices of a pressure transfer circuit of a high-pressure freezing system, (e) subjecting the specimen to high pressure for a short time, (f) intensely cooling the specimen for a short time so as to thereby freeze said specimen, (g) subjecting the specimen to atmospheric pressure, (h) bringing the specimen to a temperature at which the said substance melts, (i) pushing the specimen out of the second hollow cylinder by introducing an appropriately dimensioned instrument at the end of the second hollow cylinder, and (j) sending the specimen to further processing if desired.

[0015] Additional objects and advantages of the invention will be set forth in the description which follows, and in part will be obvious from the description, or may be learned by practice of the invention. The objects and advantages of the

invention may be realized and obtained by means of the instrumentalities and combinations particularly pointed out in the appended claims.

#### BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

[0016] The accompanying drawings, which are incorporated in and constitute a part of the specification, illustrate a presently preferred embodiment of the invention, and, together with the general description given above and the detailed description of the preferred embodiment given below, serve to explain the principles of the invention.

[0017] Preferred embodiments of the specimen holders according to the invention and their use are described below by way of example with reference to drawings, in which:

[0018] FIG. 1-A shows a longitudinal section of a specimen holder which comprises a solid heat conductive metal tube;

[0019] FIG. 1-B shows an enlarged cross section of a specimen holder according to B-B in FIG. 1-A;

[0020] FIG. 1-C shows an enlarged detail according to cutout C in FIG. 1-A;

[0021] FIG. 2-A shows a longitudinal section of a specimen holder for cylindrical, thin specimens with an inside diameter in the range of about 0.3 mm;

[0022] FIG. 2-B shows a cross section of a specimen holder according to B-B in FIG. 2-A;

[0023] FIG. 2-C shows an enlarged detail according to cutout C in FIG. 2-A;

[0024] FIG. 3-A shows a longitudinal section of a specimen holder for cylindrical, thin specimens with an inside diameter in the range of 0.3 mm;

[0025] FIG. 3-B shows a cross section of a specimen holder according to B-B in FIG. 3-A;

[0026] FIG. 3-C shows an enlarged detail according to cutout C in FIG. 3-A;

[0027] FIG. 4-A shows a diagrammatic cross section through a cooling chamber of a high-pressure freezing apparatus with a specimen holding means fitted therein for cylindrical, thin specimens

[0028] FIG. 4-B shows an enlarged detail according to cutout B in FIG. 4-A.

#### DETAILED DESCRIPTION OF A PREFERRED EMBODIMENT

[0029] For purposes of the present invention, it is desirable to obtain specimen holders which generally have at least one of the following characteristics:

[0030] transfer high cooling rates to the specimen,

[0031] permit rapid freezing under high pressure without the risk of accidents to the operating personnel,

[0032] can be provided with the capillaries made of cellulose or other materials in a relatively simple way,

Aug. 15, 2002

[0033] permit easy and reliable manipulation of the frozen specimen, especially during removal of the capillaries from the specimen holder.

[0034] The specimen holder according to the invention substantially overcomes disadvantages associated with frozen specimens which cannot be further processed very easily. The present invention makes it possible for the frozen specimens to be sent in a simple and reliable way to many, if not all, known further processing methods, such as freeze etching, freeze drying, freeze substitution, freeze cutting etc.

[0035] The specimen holder according to the present invention is typically suitable for use in apparatuses which have a separate circuit for the pressure transfer medium and coolant, such as apparatuses, for example, described in German Patent DE-B 1 806 741. This permits use in relatively small, low-cost apparatuses for high-pressure freezing. As a result, the operational risk of high-pressure freezing is reduced considerably, since these small apparatuses typically employ a pressure transfer medium volume of less than 1 ml, while apparatuses which use liquid nitrogen both as a pressure transfer medium and as a coolant, according to the prior art, require at least 100 ml of pressure transfer medium. Using the specimen holders according to the present invention in apparatuses with a separate circuit for the pressure transfer medium and coolant, about one hundred times less pressure medium would be released in the event of an accident than in the apparatuses with liquid nitrogen as the pressure transfer medium and coolant. Thus, contrary to devices of the prior art, if there would be an accident, the amount of pressure medium would only cause very minimal damage.

[0036] The specimen holders according to the invention generally meet the precondition for freezing specimens under high pressure so that the same can be successfully used for light and electron microscopy in medicine and biology. The broad spectrum of specimens which can be frozen under high pressure at low cost with the specimen holders according to the present invention should further increase significantly the possibilities for the application of the high-pressure freezing method in the natural sciences (such as the description of ultrastructures). The high-pressure freezing of relatively thick specimens appears to be particularly advantageous for applications in pathology, since it is possible with the present specimen holder to provide thicker specimens to prepare good-quality histological sections for diagnosis in an extremely short time, for instance while an operation is in progress.

[0037] The specimen holder for hydrous specimens is preferably suitable for the high-pressure freezing of biological specimens, in particular microbiopsy specimens. In a preferred embodiment, it has a metal capillary with good heat conducting properties, i.e., a heat conductive metal, which is provided at each of both its end faces with a recess for receiving the connections for a pressure transfer medium. A sheathing in the form of a hollow cylinder preferably surrounds this capillary; in a preferred embodiment, it has a slit in its central section transverse to the principal axis and, in the axial direction, a bore for receiving the capillary. The sheathing allows reliable manipulation of the specimen holder, substantially prevents buckling of the thin metal capillaries during clamping in the high-pressure freezing

system and allows the specimens to be removed from the apparatus without any problem after completion of the freezing cycle.

[0038] During the high-pressure freezing, in the interior of the metal capillary there is provided a hydrous, thin specimen which, according to a preferred embodiment, has been introduced into a capillary preferably made of a porous polymer material, most preferably of cellulose. After immersion in a substance which is liquid at room temperature, and is preferably not water-miscible (generally a hydrocarbon, for example, 1-pentene, 1-chlorobutane, etc.) and preferably has a low freezing point (<-120° C.), the cellulose capillary is introduced into the metal capillary. As a result, a thin layer of the substance is formed between the cellulose capillary and the metal capillary.

[0039] The specimen holder according to FIG. 1 has a solid metal tube 1 with good heat conducting properties (preferably made of copper, inside diameter preferably in the millimeter range, wall thickness corresponding to the inside diameter, length according to requirements in the range between about 10 and 20 mm). This tube 1 has at both end faces a recess 2, which may be shaped, for example, in the form of a cone and serves for receiving the connections for the pressure transfer medium. Fitted in this tube 1 is a very thin-walled second tube 3 made of a material with relatively good heat conducting properties, preferably a suitable polymer, the length of which preferably corresponds to the length of the tube 1 and which may be cut by means of the tools customary for the further processing of specimens. The polymer tube and metal tube are separated by a very thin layer 4 of a substance which is liquid at room temperature, and is preferably not water-miscible, most preferably a hydrocarbon (for example 1-pentene, 1-chlorobutane, etc.), which substance has a very low freezing point (<-120° C.). In use, a relatively "thick", hydrous specimen 5 is introduced into the small tube 3, the latter subsequently being immersed in the fluid, e.g. the hydrocarbon 4, and pushed into the tube 1. Excess hydrocarbon escapes on the opposite side of the tube 1 and can be manually wiped away there. During the process of high-pressure freezing, the specimen 5 is located in the small polymer tube 3.

[0040] The specimen holder according to FIG. 2 is suitable for cylindrical "thin" specimens 6 of a diameter preferably in the range of max. about 0.3 mm. It has a metal capillary 7 with good heat conducting properties, which in a preferred embodiment consists of copper and has a preferred inside diameter in the range between 0.1 and 0.5 mm, preferably of 0.3 mm, and a preferred wall thickness in the range from 0.3 to 0.3 mm. This capillary 7 is provided at each of both end faces with a recess, preferably an inner cone 2, for receiving the connections of lines, for example, for a pressure transfer medium (high-pressure lines). A sheathing 8 in the form of a hollow cylinder preferably surrounds this capillary 7 and represents an integral part of the specimen holder. It is preferably produced from stainless steel and has in its middle part a recess in the form of a slit 9 transversely to the principal axis and, in the axial direction, a bore of a diameter corresponding to the outside diameter of the capillary 7. The capillary 7 is generally pressed in a form-fitting manner into its sheathing 8. This sheathing 8 allows simple manipulation of these specimen holders, prevents buckling of the relatively thin metal capillaries during clamping into the high-pressure freezing system. The

present arrangement also generally allows the specimens to be removed without any problem from the apparatus after completion of the freezing cycle, since jamming by deformed capillary ends is reliably and substantially prevented.

[0041] During the high-pressure freezing, in the interior of the metal capillary 7 there is a hydrous, thin specimen 6, which has been introduced into a capillary 10, preferably made of a porous polymer material. The polymer material is intended on the one hand to be porous and on the other hand to be able to be cut by means of the tools customary for the further processing of biological specimens. For example, capillaries made of porous cellulose, as are used in blood dialysis units, satisfy both these criteria. In a preferred embodiment, such a capillary 10 has an inside diameter in the range from 0.1 to 0.5 mm and a wall thickness in the range from 0.01 to 0.1 mm. After immersion in a fluid 4 which is liquid at room temperature and preferably not water-miscible, most preferably a hydrocarbon or a halogenated hydrocarbon (for example 1-pentene, 1-chlorobutane, etc.), which has a low freezing point (<-120° C.), the capillary 10 made of the porous material is introduced into the metal capillary 7. As a result, the capillary 10 made of the porous material and the metal capillary 7 are separated from each other by a thin layer of the substance 4, preferably a hydrocarbon.

[0042] The capillaries preferably made of cellulose preferably originate, for example, from blood dialysis units. They can be used in polyvalent applications and permit the high-pressure freezing of small organisms (for example Nematoda), Protista, microorganisms, but also tissue microbiopsies (brain, liver, etc.) as well as gels, suspensions, etc.

[0043] The specimen holder according to FIG. 3 is likewise suitable for cylindrical, relatively thin specimens 6 of a diameter in the range of max. 0.3 mm and comprises a metal capillary 7 with good heat conducting properties (preferably made of copper), which is provided at each of its end faces with a recess 2, for example in the form of a cone, for receiving the connections for the pressure transfer medium.

[0044] As distinct from the specimen holder from FIG. 2, the capillary 7 is sheathed at both its ends with a hollow cylinder 11, preferably made of stainless steel, which represent an integral part of the specimen holder and the hollow cylinders 11 preferably can be manipulated together with the holder. The difference with respect to the sheathing 8 from FIG. 2 is that the cooling of the specimen is generally more efficient, but the specimen holder as a whole can be less stable. The hydrous specimen 6 inside the metal capillary 7 has been introduced into a capillary 10 of the type described, made of a porous polymer material. The metal capillary and the capillary made of the porous material are separated in the same way as described for the specimen holders from FIGS. 1 and 2 by a layer of a substance 4 which is liquid at room temperature and generally not water-miscible, preferably a hydrocarbon or halogenated hydrocarbon (for example 1-pentene, 1-chlorobutane, etc.), which has a very low freezing point (<-120° C.) and ensures optimum heat conduction between specimen 6 and metal capillary 7.

[0045] The method of using the specimen holders according to the invention for the purpose of high-pressure freezing of hydrous specimens has the following preferred method

steps. For the relatively "thick" specimens of FIG. 1, the same method is used; however, the manipulations can be carried out more easily, since the dimensions are larger.

[0046] The hydrous specimens 6, preferably made of biological material, are introduced into the porous capillaries 10 and the metal capillary 7 as follows: the capillaries 10, preferably made of porous cellulose, are generally bonded by a suitable adhesive in a way known per se in pipette tips made of plastic (tips of so-called Eppendorf® micropipettes). By fitting these tips onto a micropipette of a corresponding size, the specimen is introduced into the porous capillary 10, either by utilizing the capillary forces or by slight suction, while observing through a stereo magnifying glass. In the case of the biopsy needles often used today, before being sucked up, the tissue prepared for microbiopsy should be slit lengthwise by means of a razor blade or some other suitable instrument.

[0047] While observing through a stereo magnifying glass, the specimen holders are placed in a Petri dish filled with fluid 4, preferably a hydrocarbon or halogenated hydrocarbon which is not water-miscible and has a low melting point, whereby the metal capillaries 7 fill up with the fluid. A filter paper lying on the bottom of the Petri dish, if needed, serves for removing excess specimen fluid on the surface of the capillary 10 of a porous material, filled with the specimen 6. The capillary 10, freed in this way of excess specimen fluid, is manually introduced into the metal capillaries 7 with the aid of two tweezers or other suitable instruments. The length of the porous capillary 10 should in this case correspond approximately to the length of the metal capillary 7. This is important, since only that region of the specimen 6 in the porous capillary 10 which is in the region of the metal capillary 7 not sheathed by the sheathing 8 or 11 is frozen well by the freezing cycle. Providing the specimen holders with the specimen 6 should take only just a few seconds, in order to minimize outside influences on the specimen 6. The specimen holders provided with the specimens are freezed immediately.

[0048] The method of freezing the specimen holders according to the invention under high pressure is explained in FIG. 4 on the basis of a specimen holder 12 according to FIG. 3, but also applies analogously to the specimen holders which are represented in FIGS. 1 and 2. In FIG. 4, the specimen holder 12 is fitted into a specimen holder receptacle 13 of a design known per se and is securely clamped by means of an O-ring 14. Subsequently, the filled specimen holder receptacle 13 is introduced into the centered bores 15 provided for this purpose in a high-pressure freezing system. The two sheathings 11 of the specimen holder 12 thereby fit into the centered bores 15. The central portion of the specimen holder 12, corresponding to the unsheathed part of the metal capillary 7, lies in a cavity 16, which is formed by a slit of the cylindrical guide 17. This is necessary in order to allow the greatest possible volumes of the coolant (K) per unit of time to impinge on the specimen holder 12.

[0049] The specimen holder is subsequently connected to the circuit of the pressure transfer medium: the metal capillary 7 of the specimen holder 12 is pressed at its one end onto the conical opening of a high-pressure line 20 by means of a solid cone 18, with a specific force (F) which is generated, for example, by a compressed-air cylinder 19. The specimen 6 is consequently connected in a sealed

manner by the specimen holder 12, clamped in place in this way, to the high-pressure system, i.e. the conically tapered high-pressure line 20, and is fixed in the bores 15. The high-pressure line 20 filled with a pressure transfer medium, for example, hydraulic oil 21, which line is connected to a pressure generator 22, subjects the specimen 6 to the chosen high pressure at the desired point in time and said specimen is subsequently frozen.

[0050] The coolant is briefly deflected onto the metal capillary 7 via a solid feeding means (not shown), which completely surrounds the cavity 16. By mechanical coupling of the coolant deflection and the release of the arresting of the ram 23, pressure values in the range between 1000 and 3000 bar, preferably in a range between 1600 and 2045 bar, are achieved in the specimen 6 within a time period in the range from 0.10 to 50 msec, preferably less than 20 msec, for example around 10 msec. Synchronously with this, a cooling in the range between 50 (fifty) and  $10^6$  (1 million) ° K/sec, preferably of several 1000° K/sec, is achieved at the surface of the metal capillary 7. As a result, a temperature in the range between -90 and -196° C. is obtained in the specimen 6, whereby the latter is frozen. The relatively "thick" specimens represented in FIG. 1 may expediently also be frozen at lower cooling rates (less than 5000° K/sec). For cooling, a commercially available coolant, preferably a hydrocarbon with a low boiling point, for example, propane, can be used, which coolant can be stored in a metal tank which is precooled from outside with liquid nitrogen to a temperature of about -180° C.

[0051] Directly after freezing the specimen 6, the compressed-air piston 24 of the compressed-air cylinder 19 is drawn back and the specimen 6 in the specimen holder 12 is removed from the high-pressure freezing system with the aid of the handle 25 on the specimen holder receptacle 13 and is immediately immersed in liquid nitrogen at atmospheric pressure. Under liquid nitrogen, the specimen holder 12 is manually removed from the specimen holder receptacle 13 with the aid of tweezers. The specimen holder 12 is kept in liquid nitrogen until further processing of the specimen 6.

[0052] The now frozen specimen 6 is removed as follows from the specimen holder 12: under liquid nitrogen, the specimen holder 12 is introduced into a cryostat. At the temperature of the cryostat (in the range generally from -90 to -140° C., for example -120° C.), the hydrocarbon or other substance 4 (for example 1-pentene with a melting point of -165° C.), which is surrounding the cellulose capillary 10, melts. As a result, the frozen capillaries 10 made of the porous polymer material can be manually pushed out of the metal hollow cylinder 7 with the aid of a cooled cylinder (in the range around -120° C.), preferably a metal instrument, for example, a drill of a corresponding diameter, while observing through a stereo magnifying glass. The capillary 10 with the specimen 6, removed in such a way, can in turn be stored in liquid nitrogen or be further processed. Subsequently, the specimen 6 in the capillaries 10 can be expediently sent for further processing by one of the methods known per se. The capillary 10 made of the porous polymer material, preferably porous cellulose, does not hinder this, in particular does not hinder the cutting of the specimen.

[0053] The same applies to the manipulation of the relatively "thick" specimens 5. The thin-walled small polymer

tube 3 of the specimen holder from FIG. 1 likewise allows any type of further processing.

[0054] Additional advantages, features and modifications will readily occur to those skilled in the art. Therefore, the invention in its broader aspects is not limited to the specific details, and representative devices, shown and described herein. Accordingly, various modifications may be made without departing from the spirit or scope of the general inventive concept as defined by the appended claims and their equivalents.

[0055] The Priority Document, Swiss Patent Application 0053/97, filed Jan. 13, 1997 is incorporated herein in its entirety by reference. In addition, all documents and references referred to herein are specifically incorporated by reference.

[0056] For the purposes of the following claims, the terms "the", "a" and "an" are intended as referring to singular or plurals.

What is claimed is:

1. A specimen holder for a hydrous specimen comprising:
  - (a) an inner hollow cylinder of a heat conductive material,
  - (b) an inner hollow cylinder of a material which can be cut,
  - (c) a cylindrical interior space within said inner hollow cylinder for receiving said specimen, and
  - (d) the space between the inner hollow cylinder and an inside wall of the outer hollow cylinder being filled by a layer which is liquid at room temperature.
2. A specimen holder as claimed in claim 1, wherein the inner hollow cylinder is a small tube comprising a polymeric material.
3. A specimen holder as claimed in claim 1, wherein the inner hollow cylinder is a capillary comprising a porous polymer material.
4. A specimen holder as claimed in claim 1, wherein the outer hollow cylinder includes two end faces, each of which include a recess capable of accomodating connecting lines.
5. A specimen holder as claimed in claim 1, wherein said holder further comprises a sheathing comprising a metal and has the form of a hollow cylinder, said sheathing being provided with a bore in an axial direction thereof that is capable of receiving a metal capillary, and said sheathing further being provided about a central region thereof with a cavity in the form of a slit that is arranged in a radial direction thereof.
6. A specimen holder as claimed in claim 4, wherein said end faces both comprise hollow cylinders, said cylinders being capable of receiving said outer hollow cylinder but do not enclose said outer hollow cylinder over its entire length.
7. A specimen holder as claimed in claim 1, wherein said layer in said space comprises a water-insoluble substance.
8. A specimen holder as claimed in claim 1, wherein the outer cylinder has an inside diameter in the range from 0.1 to 0.5 mm and a wall thickness in the range from 0.3 to 0.5 mm.
9. A specimen holder as claimed in claim 1, wherein the inner hollow cylinder comprises a porous polymer material and has an inside diameter in the range from 0.1 to 0.5 mm and a wall thickness in the range from 0.01 to 0.1 mm.

Aug. 15, 2002

10. A method for freezing hydrous specimens under high pressure using a specimen holder, said method comprising:
- (a) introducing the hydrous specimen into a first hollow cylinder,
  - (b) filling the cylindrical interior space of a second hollow cylinder with a substance which is liquid at room temperature,
  - (c) manually introducing the first hollow cylinder into the interior space of the second hollow cylinder,
  - (d) connecting the second hollow cylinder to corresponding receiving devices of a pressure transfer circuit of a high-pressure freezing system,
  - (e) subjecting the specimen to high pressure for a short time,
  - (f) intensely cooling the specimen for a short time so as to thereby freeze said specimen,
  - (g) subjecting the specimen to atmospheric pressure,
  - (h) bringing the specimen to a temperature at which the said substance melts,
  - (i) pushing the specimen out of the second hollow cylinder by introducing an appropriately dimensioned instrument at the end of the second hollow cylinder, and
  - (j) sending the specimen to further processing if desired.
11. A method as claimed in claim 10, wherein the first hollow cylinder is a capillary made of a porous polymer material, and the specimen is introduced into the capillary by capillary forces.
12. A method as claimed in claim 10, wherein the first hollow cylinder is a capillary made of a porous polymer material, and the specimen is introduced into the capillary by suction.
13. A method as claimed in claim 10, wherein the substance in the interior space of the second hollow cylinder comprises a hydrocarbon or halogenated hydrocarbon which is not water-miscible and has a low melting point.
14. A method as claimed in claim 10, wherein a chosen pressure value is built up in the specimen within 0.10 to 50 msec.
15. A method as claimed in claim 14, wherein the pressure value in the specimen is in the range between 1000 and 3000 bar.
16. A method as claimed in claim 10, wherein a cooling rate of 5000 to  $10^6$  (1 million) °K/sec is reached on a surface of the second cylinder and a temperature between -90 and -196° C. is reached in the specimen.
17. A method as claimed in claim 10, wherein a hydrocarbon with a low boiling point, which is precooled with liquid nitrogen to a temperature of -180° C., is used as the substance.
18. A method as claimed in claim 10, wherein, after the intense cooling step, the specimen holder is brought to a temperature in the range from -90 to -140° C., whereby the substance melts.

\* \* \* \* \*